

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Martina Seifrtová

2013

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

**Doktorský studijní program
Lékařská chemie a biochemie**

Molekulární mechanismy odpovědi kmenových buněk na cytostatickou terapii

The molecular mechanisms of stem cells response to cytostatic treatment

Mgr. Martina Seifrtová

Školitel: doc. MUDr. Martina Řezáčová, Ph.D.

Hradec Králové, 2013

Obhajoba dne:

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Hradec Králové, 22. 9. 2013

Úvodem bych ráda poděkovala všem spolupracovníkům a přátelům, kteří se podíleli na vzniku této práce.

Mé poděkování patří především:

- školitelce doc. MUDr. Martině Řezáčové, Ph.D. za výborné vedení během mého studia, za odbornou pomoc, ochotu, rady a vytvoření příznivých pracovních podmínek,
- Mgr. Radimu Havelkovi, Ph.D. za spolupráci a flow-cytometrické analýzy,
- MUDr. Tomášovi Soukupovi a kolektivu Ústavu lékařské histologie a embryologie za poskytování kmenových buněk,
- doc. MUDr. Aleně Stoklasové, CSs. a doc. MUDr. Jaroslavu Cermanovi za ochotu pomoci při konzultacích a řešení problémů,
- laborantce Nadě Mazánkové za pečlivou spolupráci při kultivaci buněk
- mé milované rodině za podporu a pochopení v průběhu studia.

Obsah

1	ÚVOD	10
2	PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY	11
2.1	Reakce buněk na poškození DNA	11
2.1.1	Signální dráhy aktivované bezprostředně po poškození DNA	11
2.1.1.1	Role ATM, ATR kináz a proteinu p53	11
2.1.1.2	Aktivace mitogeny aktivovaných proteinkináz	14
2.1.2	Výsledné reakce buněk na genotoxický stres	16
2.1.2.1	Zástava buněčného cyklu	16
2.1.2.2	Reparace poškození	17
2.1.2.3	Apoptóza	18
2.1.2.4	Senescence	20
2.2	Kmenové buňky	23
2.2.1	Mezenchymální kmenové buňky zubní pulpy	25
2.2.2	Odpověď kmenových buněk na genotoxický stres	26
2.3	Cytostatika	27
2.3.1	Cisplatina	27
2.3.2	Mitoxantron	29
3	CÍLE PRÁCE	30
4	MATERIÁL A METODIKY	31
4.1	Buněčné kultury a kultivační podmínky	31
4.1.1	Kmenové buňky zubní pulpy	31
4.1.2	Lidské dermální fibroblasty	32
4.2	Cytostatika	32
4.3	Stanovení cytotoxicity	32
4.4	Stanovení proliferace	33
4.5	Analýza buněčného cyklu	33
4.6	Měření aktivity kaspáz	34
4.7	Elektroforéza a Western blotting	34
4.8	Imunocytochemie	35
4.9	Stanovení aktivity β -galaktosidázy	35
4.10	Stanovení apoptózy pomocí TUNEL assay	36
4.11	Statistická analýza	36
5	VÝSLEDKY	37
5.1	Vliv cisplatiny na kmenové buňky zubní pulpy a dermální fibroblasty	37
5.1.1	Cytotoxicita cisplatiny	37
5.1.2	Proliferace a procentuální zastoupení živých buněk	38
5.1.3	Aktivace kaspáz a indukce apoptózy	40
5.1.4	Analýza buněčného cyklu	42
5.1.5	Signální dráha proteinu p53	42
5.1.6	Aktivace mitogeny aktivovaných proteinkináz (MAPK)	43
5.1.7	Indukce předčasné senescence	44

5.2	Vliv mitoxantronu na kmenové buňky zubní pulpy a dermální fibroblasty ...	45
5.2.1	Cytotoxicita mitoxantronu	45
5.2.2	Proliferace a procentuální zastoupení živých buněk po nižších koncentracích mitoxantronu.....	46
5.2.3	Indukce předčasné senescence po nižších koncentracích MTX	49
5.2.4	Aktivace signálních drah po působení MTX	51
5.2.5	Navození apoptózy po působení vyšších koncentrací MTX.....	53
6	DISKUZE	56
7	ZÁVĚR	67
8	LITERATURA	68

Použité zkratky

ATM – ataxia telangiectasia proteinkináza

ATP – adenosintrifosfát

ATR – ataxia telangiectasia Rad-3 related proteinkináza

BCA – bicinchoninová kyselina

BER – báзовá excizní reparace

BRCA1 – protein nádoru prsu (breast cancer 1)

Cdc25 – serin-threonin proteinfosfatáza

Cdk – cyklin-dependentní kináza

CP - cisplatina

Cip1 – Cdk interagující protein 1

DAPI – 4,6-diamino-2-fenyldiol

DF – dermální fibroblasty

DISC – smrt indukující signální komplex

DMEM – Dulbeccovo modifikované Eagleovo médium

DMSO – dimethyl sulfoxid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DNA-PK – DNA dependentní proteinkináza

DR – smrtící receptor (death receptor)

DSBs – dvojité zlomy DNA (double strand breaks)

dUTP – deoxyuridintrifosfát

E2F – transkripční faktor 2

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

EGF – epidermální růstový faktor

ERK – extracelulárními signály regulovaná kináza

FITC – fluorescein isothiokyanát

FCS – fetální telecí sérum

FSC – dopředný rozptyl světla

γ -H2AX – histon fosforylovaný na serinu 139

Glu – glutamin

Gly - glycin

Gy – Gray, jednotka dávky záření

HR – homologní rekombinace

Chk – checkpoint kináza

INK4a – inhibitor cyklin-dependentní kinázy 4a

JNK – c-Jun N-terminální kináza

KBZP – kmenové buňky zubní pulpy

MAPK – mitogeny aktivované proteinkinázy

MEK – mitogeny aktivovaná proteinkináza kináza

MKB – mezenchymální kmenové buňky

MTX – mitoxantron

NER – nukleotidová excizní reparace

NHEJ – nehomologní spojování konců

NK – natural killer

PBS – fosfátový pufr

PDGF – destičkový růstový faktor

PI – propidium jodid

Pro - prolin

Rb – retinoblastoma protein

SA- β -galaktosidáza – β -galaktosidáza asociovaná se senescencí

SAPK – stresem aktivované proteinkinázy

SDS – dodecylsulfát sodný

SDS-PAGE – elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného

Ser – serin

SIPS – stresem indukovaná předčasná senescence

SSC – boční rozptyl světla

TBS – Tris pufr (Tris-buffered saline)

TGF – transformující růstový faktor

TEMED – tetramethylethylen diamin

Thr – threonin

TNF – nádorový nekrotizující faktor

Tyr – tyroxin

UV – ultrafialové záření

Pozn. Zkratky a názvy proteinů a genů, pro něž není zažítý český ekvivalent, nejsou uvedeny.

1 ÚVOD

Jeden z hlavních přístupů v terapii nádorových onemocnění představuje léčba cytostatiky. Stěžejním mechanismem této terapie je navození apoptotického procesu u nádorových buněk. Dnes je již dobře známo, že v průběhu léčby jsou chemoterapeutiky ovlivňovány nejen buňky nádorové, ale i buňky zdravé. Jedním z nejsledovanějších typů zdravých somatických buněk jsou v současné době buňky kmenové. Reakce kmenových buněk na genotoxický stres je stále předmětem výzkumů, a nezodpovězenou otázkou zůstává, do jaké míry se mohou tyto buňky podílet na vzniku tumorů nebo jiného onemocnění plynoucího z jejich genomové nestability. Kmenové buňky přetrvávají v tkáních dlouhodobě, a i z tohoto důvodu je nutné doplnit jejich charakterizaci v oblasti regulace proliferace, senescence a apoptózy a rozšířit znalosti o jejich chování vůči genotoxickým stresorům jako jsou cytostatika.

V práci se zabývám reakcí mezenchymálních kmenových buněk izolovaných ze zubní pulpy na terapii dvěma vybranými cytostatiky - cisplatinou a mitoxantronem. Reakci těchto buněk porovnávám s reakcí normálních lidských dermálních fibroblastů a diskutuji zjištěné odlišnosti mezi těmito dvěma buněčnými typy.

2 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

2.1 Reakce buněk na poškození DNA

V eukaryotických buňkách vede závažné poškození DNA k aktivaci celé řady mechanismů vedoucích k reparaci či k odstranění poškozené buňky. Souběžně jsou aktivovány jak signály vedoucí ke smrti buňky, tak signály zajišťující její přežití a proliferaci. V důsledku poškození DNA dochází k přechodné zástavě buněčného cyklu v G1/S nebo G2/M fázi a během této doby dojde buď k opravě poškození DNA, nebo v případě nereparovatelného poškození k odstranění poškozených buněk, a to zejména apoptózou (Coultas a Strasser 2000). Mimo tyto mechanismy mohou některé buňky reagovat na genotoxický stres trvalou zástavou buněčného cyklu, tzv. stresem-indukovanou předčasnou senescencí (SIPS) (Schmitt 2007). Který z mechanismů buněčné odpovědi převáží, závisí zejména na buněčném typu a rozsahu poškození DNA. V práci jsme se podrobně zabývali otázkami indukce apoptózy, SIPS a přechodné zástavy buněčného cyklu po poškození DNA, tudíž v následujících řádcích shrnuji obecné poznatky o těchto procesech.

2.1.1 Signální dráhy aktivované bezprostředně po poškození DNA

K pochopení dějů probíhajících v reakci na genotoxický stres je nutné objasnění základních molekulárních mechanismů, které probíhají bezprostředně po poškození DNA. Mezi nejzávažnější formu poškození DNA patří dvojité zlomy této dvoušrobovice (DNA double-strand breaks, DSBs), které vedou k aktivaci rozsáhlé sítě signálních drah, z nichž nejdůležitější jsou popsány v následujících dvou podkapitolách. Vybrané signální cesty určující osud buňky po poškození DNA jsou znázorněny na obrázku č. 1.

2.1.1.1 Role ATM, ATR kináz a proteinu p53

V místě poškození polynukleotidových řetězců DNA dochází záhy po poškození k remodelaci chromatinu a formování tzv. ohnisek neboli foků. V těchto focích se během několika minut akumulují a aktivují proteiny detekující postižené místo. Mezi tyto proteiny patří například Mre11, Nbs1, Rad50 (proteiny reparačního komplexu

MRN), proteiny MDC1, 53BP1, Hus1, Rad1, Rad9, Rad17, Rad26, RPA a mnoho dalších (Bekker-Jensen et al. 2006). Dochází k aktivaci významných proteinkináz příbuzných fosfatidylinositol-3 kináze (PI3K): ATM (ataxia-telangiectasia mutated), ATR (ataxia-telangiectasia and Rad3-related) a DNA-PKcs (catalytic subunit of DNA-dependent proteinkinase). Která z těchto kináz bude aktivována, závisí zejména na typu poškození DNA a druhu genotoxického agens. V případě dvojitých zlomů DNA vyvolaných například působením mitoxantronu je přednostně aktivována ATM kináza, zatímco po působení alkylačního cytostatika cisplatiny dochází k aktivaci ATR. ATM kináza se v normálních buňkách vyskytuje ve formě neaktivního dimeru či multimeru. K aktivaci ATM dochází autofosforylací na serinu 1981, která vede k disociaci dimeru za vzniku monomeru se serin-threonin kinázovou aktivitou (Bakkenist a Kastan 2003). Hlavní úlohou ATM je zejména fosforylace a aktivace dalších proteinů podílejících se na reparaci, zástavě buněčného cyklu nebo apoptóze, a hraje tak ústřední roli v buněčné odpovědi na poškození DNA. Mezi nejvýznamnější cíle ATM patří například protein p53, Chk1, Chk2, BRCA1, Nbs1 nebo histon H2AX (Khanna et al. 2001). ATR kináza je aktivována jak v reakci na DSBs, tak meziřetězcovými kroslinky, adukty bazí nebo jednovláknovými zlomy DNA. Stejně jako ATM kináza, ATR fosforylací přenáší signály na cílové molekuly. Mezi hlavní substráty pro ATR patří zejména Chk1, p53, Rad17, BRCA1 a histon H2AX (Zhao a Piwnica-Worms 2001, Cortez et al. 2001, Ward a Chen 2001).

Jedním z hlavních cílů ATM a ATR kinázy je protein p53, tumorový supresor, který se v reakci na poškození DNA může podílet na indukci apoptózy, senescence, zástavě buněčného cyklu nebo opravě poškozené DNA. Gen pro protein p53 je lokalizován na krátkém raménku chromosomu 17 a jeho délka je přibližně 20 kilobází. Je složen z 11 exonů, z nichž první je nekódující, a 10 intronů (Kotala et al. 2002). Exprimovaný protein p53 je tvořen 393 aminokyselinami a obsahuje 3 hlavní funkční domény. První, transaktivační doména, se vyskytuje na N-konci proteinu a zodpovídá za aktivaci transkripce cílových genů. Na N-konci se nachází také vazebné místo pro Mdm-2. Druhá doména zodpovídá za sekvenčně specifickou vazbu na cílové sekvence DNA. Třetí doména je lokalizována na C-konci a představuje ji tetramerizační element tohoto proteinu, který je důležitý pro správnou funkci p53 (Ko a Prives 1996).

V normálních buňkách je hladina proteinu p53 velmi nízká. Vznikající nově syntetizovaný protein je rychle degradován vlivem proteinu Mdm2 (mouse double minute 2) v proteasomu. Mdm2 je ubikvitin ligáza, která mimo jiné ubikvitinuje

(kovalentně připojuje ubikvitin k lysinům cílového proteinu) protein p53, aby mohl být rozeznán aparátem proteasomu a degradován (Uldrijan et al. 2002). Za normálních okolností jsou protein p53 a Mdm2 navzájem v autoregulatorní vazbě. Protein p53 indukuje transkripci Mdm2, ten se obratem váže na p53 a podpoří tak jeho degradaci. Samotná vazba Mdm2 na p53 pouze blokuje jeho transkripční aktivitu. K degradaci proteinu je nutný transport komplexu p53-Mdm2 z jádra buňky do cytoplasmy (Alarcon-Vargas a Ronai 2002).

Jak již bylo zmíněno, ATM, popřípadě ATR kináza, se podílejí na stabilizaci a aktivaci proteinu p53 fosforylací na různých aminokyselinových zbytcích, přičemž jednou z nejdůležitějších fosforylací provádí tyto kinázy na serinech 15 a 392. Protein p53 je fosforylován na serinu 15 v doméně, kde se nachází místo pro vazbu Mdm-2, čímž dojde ke snížení afinity p53 k Mdm2 a vzestupu celkového množství p53 (Michael a Oren 2003). Fosforylace na serinu 392 zprostředkovává stabilizaci proteinu p53 tím, že zvyšuje jeho schopnost vázat se na specifické sekvence DNA (Thompson et al. 2004). Další posttranslační modifikace zahrnují fosforylaci na serinech 6, 9 a 33, defosforylaci na serinu 376 a acetylaci na lysinech 320, 373 a 382. Všechny tyto modifikace udělují proteinu p53 stabilitu a transkripční aktivitu (Canman et al. 1998, Alarcon-Vargas a Ronai 2002). K dalším aktivátorům proteinu p53 patří Chk2 a Chk1. Tyto kinázy jsou fosforylovány prostřednictvím ATM/ATR kináz a dále pak zprostředkovávají aktivaci proteinu p53 fosforylací na serinu 20 (Poehlmann a Roessner 2010).

Aktivovaný protein p53 se dále váže na specifické sekvence DNA a působí jako transkripční faktor pro další geny ovlivňující buněčný osud. V závislosti na rozsahu poškození DNA může aktivovat cesty vedoucí k přechodné, popřípadě trvalé zástavě buněčného cyklu, nebo eliminovat poškozené buňky spuštěním apoptotického procesu (Ko a Prives 1996).

Protein p53 aktivuje inhibitor cyklin-dependentních kináz protein p21^{WAF1/Cip1}, čímž se významně podílí na regulaci progresu buněčným cyklem. O signální dráze p53-p21^{WAF1/Cip1} je blíže pojednáno v kapitole o zástavě buněčného cyklu. Dále se protein p53 podílí na indukci apoptotického procesu. Tento mechanismus je popsán v kapitole o apoptóze.

2.1.1.2 Aktivace mitogeny aktivovaných proteinkináz

Některé buněčné typy reagují bezprostředně po poškození DNA aktivací různých cest mitogeny aktivovaných proteinkináz (MAPK). MAPK jsou strukturně příbuzné serin-threoninové kinázy, kterých bylo v savcích buňkách identifikováno velké množství. Mezi nejvýznamnější a doposud nejlépe prostudované patří tři MAPK: extracelulárními signály regulované kinázy ERK1/2, JNK (c-Jun-N-terminální kinázy) a p38 kinázy. Poslední dvě jmenované MAPK jsou také známé jako stresem aktivované proteinkinázy (SAPK) (Johnson a Lapadat 2002). Ačkoli se vyskytují výjimky, obecně jsou JNK a p38 kinázy spojovány s aktivací apoptotického programu, zatímco signály zprostředkované ERK1/2 kinázami přispívají k buněčnému přežívání (Golding et al. 2007).

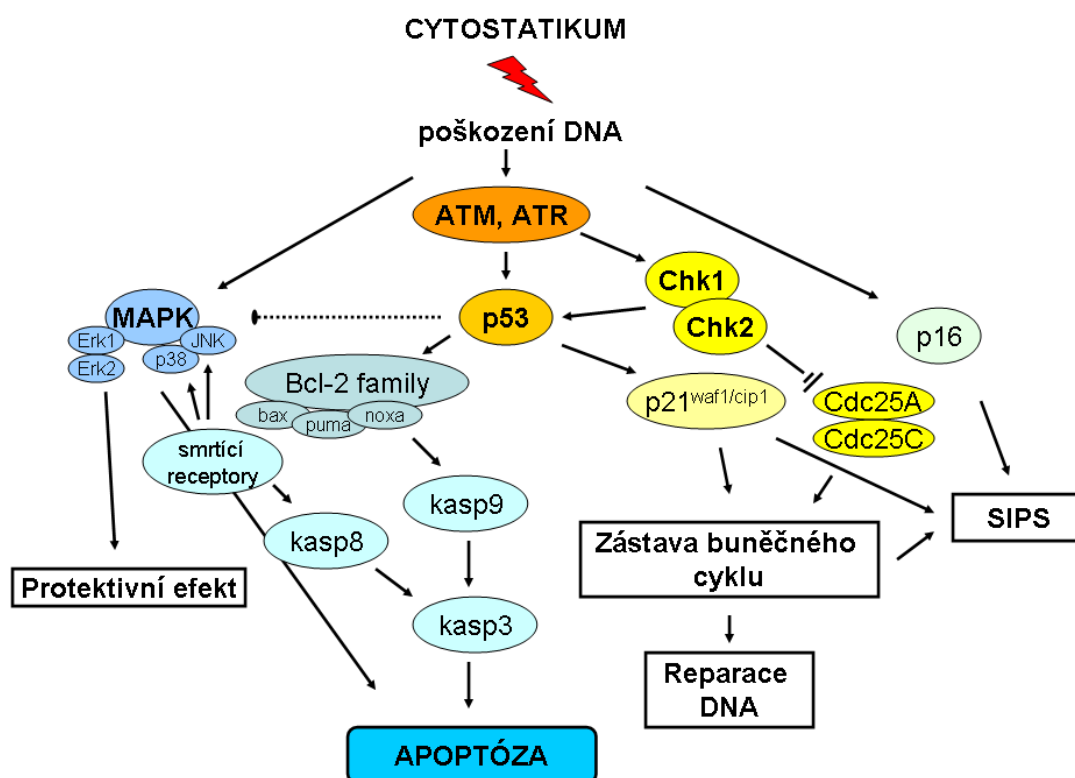
MAPK mohou být aktivovány velkým množstvím odlišných stimulů. K jejich aktivaci dochází například zevními receptorovými drahami, zejména prostřednictvím hormonů a růstových faktorů účinkujících přes tyrosin kinázové receptory (EGF-epidermal growth factor, PDGF-platelet-derived growth factor, FGF-fibroblast growth factor, insulin aj.). Mezi další aktivátory MAPK patří transformující růstové faktory (TGF- β) účinkující přes serin-threoninové kinázové receptory a zánětlivé cytokiny z rodiny TNF (tumor necrosis factor). Na aktivaci MAPK se také mohou podílet kinázy ATR a ATM (Kyriakis a Avruch 2001, Tang et al. 2002).

K aktivaci jednotlivých kináz dochází duální fosforylací na threoninových (Thr) a tyrosinových (Tyr) zbytcích ve specifickém motivu (Thr-Xaa-Tyr) předcházejícími kinázami. Pro klasické ERK kinázy (ERK1/2/5) je tento motiv Thr-Glu-Tyr, pro p38 kinázy Thr-Gly-Tyr a pro JNK kinázy Thr-Pro-Tyr (Platanias 2003). Aktivované MAPK následně fosforylují velké množství proteinů, zahrnující transkripční faktory, cytoskeletální proteiny, kinázy a mnohé další enzymy, které se následně podílejí na indukci apoptózy nebo buněčném přežívání (Qi a Elion 2005).

ERK1/2 kinázy jsou aktivovány kaskádovitými fosforylacemi Ras – Raf – MEK1/2. MEK1/2 je hlavním enzymem pro fosforylací ERK1/2 na threoninu 202 a tyrosinu 204. Aktivované ERK1/2 kinázy dále fosforyluje další substráty - nukleární proteiny (p53, Elk-1, c-Fos, c-Myc, SRC-1, Pax6, NF-AT a MEF2), membránové proteiny (CD120a, Syk, calnexin), cytoskeletální proteiny (neurofilamenty) a hrají tak významnou roli v regulaci transkripční aktivity (Chen et al. 2001). ERK1/2 také regulují

posttranskripční seskupení Cyklinu D a Cdk4/6, který řídí průchod G1/S fází a může se tak podílet na regulaci buněčného cyklu (Seeger a Krebs 1995).

Stresové kinázy JNK a p38 po jejich aktivaci přispívají k buněčné smrti. JNK kinázy zprostředkovávají výslednou odpověď zejména přes aktivaci transkripčních faktorů, například c-Jun, ATF2/3, Elk-1/3, p53, NFAT4, HSF11, c-Myc (Johnson a Nakamura 2007). Kinázy p38 působí přes aktivaci transkripčních faktorů ATF1/2, MEF2A, Sap-1, Elk-1, NF- κ B, Ets-1 a p53, dále pak fosforyluje například fosfolipázu A2, a některé proteiny asociované s mikrotubuly (Roux a Blenis 2004). Je třeba zdůraznit, že aktivace jednotlivých MAPK je silně závislá na buněčném typu a tak u některých buněčných linií MAPK do procesů buněčné smrti a apoptózy nezasahují (Brozovic a Osmak 2007).



Obr. 1 Přehled vybraných signálních cest ovlivňujících buněčný osud po poškození DNA

V důsledku poškození DNA dochází k aktivaci řady signálních cest zapříčiňujících podporu reparace DNA, zástavu buněčného cyklu, apoptózu či stresem indukovanou předčasnou senescenci (SIPS). Na obrázku jsou znázorněny vybrané klíčové proteiny podílející se na těchto procesech.

2.1.2 Výsledné reakce buněk na genotoxický stres

V předchozích odstavcích byly stručně objasněny molekulární mechanismy, které mohou probíhat v reakci na poškození DNA. Nyní postupně blíže definuji procesy zástavy buněčného cyklu, reparace, apoptózy a SIPS.

2.1.2.1 Zástava buněčného cyklu

Dojde-li k reparovatelnému poškození DNA, buňky jsou vybaveny mechanismy, které jim nedovolí pokračovat v dělení s poškozenou genetickou informací. Buněčný cyklus je pod kontrolou řady proteinů, které v reakci na poškození DNA mohou zastavit buněčné dělení a umožnit tak dalším molekulám opravu poškození. Průchod buněčným cyklem je regulován zejména komplexy cyklin-dependentních kináz (Cdk) a cyklinů. Cdk jsou serin-threoninové proteinkinázy, které pokud jsou ve vazbě na příslušný cyklin, umožňují buňkám projít celým cyklem. Buňka kontroluje během cyklu genetickou informaci ve dvou hlavních kontrolních bodech, G1/S a G2/M. Přechod buněk z G1 do S fáze umožňují komplexy Cdk4 a Cdk6 s cykliny typu D, v pozdní G1 fázi také Cdk2 s cykliny typu E. V S-fázi se uplatňuje komplex Cdk2 s cyklinem A. Průchod G2 fází je umožněn komplexem Cdk1 s cyklinem B (Řezáčová a Vávrová 2011). Všechny tyto komplexy za normálních okolností fosforylují a tím inaktivují Rb protein. Rb protein se v buňce vyskytuje ve vazbě na transkripční faktor E2F, který je nezbytný pro aktivaci transkripce genů nutných pro progresi buněčným cyklem. V této vazbě však E2F faktor není schopen zahájit transkripci. Fosforylací Rb proteinu se faktor E2F uvolní z vazby, spustí se proces transkripce a buňka je dále schopna postoupit do další fáze cyklu (Knudsen a Wang 1997).

Jiná situace nastává, dojde-li k poškození genetické informace a buňka potřebuje čas na reparaci. Za těchto okolností vstupují do hry tzv. inhibitory cyklin-dependentních kináz, které se velkou měrou podílejí na regulaci aktivity komplexů Cdk s cykliny. Inhibitory Cdk můžeme rozdělit na dvě skupiny, první tvoří rodina proteinů označovaná jak CIP (Cdk interacting protein), kam patří například proteiny p21^{WAF1/Cip1}; p27^{KIP1} (Sherr a Roberts 1994). Druhou pak tvoří rodina inhibitorů Ink4 specificky inhibujících komplexy Cdk4 a Cdk6 s cyklinem D. Z těchto inhibitorů jsou nejvýznamnější proteiny p16^{INK4a} a p15^{INK4b} (Siebert et al. 1996). Největší pozornost je věnována proteinu p21^{WAF1/Cip1}, který je aktivován po poškození DNA zejména prostřednictvím proteinu p53 (Ko a Prives 1996). Zvýšená exprese p21 inhibuje aktivitu komplexů Cdk4/cyklin

D a Cdk2/cyklin E (Dulic et al. 1994), což vede k hypofosforylaci Rb proteinu a tím k zábraně uvolnění faktoru E2F z komplexu. Důsledkem je pak nemožnost přechodu z G1 do S fáze, tedy pozastavení buněčného cyklu (Agarwal et al. 1998). Mezi další mechanismy vedoucí k zástavě buněčného cyklu v G1/S fázi patří interakce proteinu p21^{WAF1/Cip1} s proliferačním antigenem PCNA. Protein p21^{WAF1/Cip1} se také podílí na regulaci komplexu Cdk1/Cyklin B a ovlivňuje tak také přechod buněk z G2 fáze do mitózy (Cazzalini et al. 2010).

K dalším významným proteinkinázám regulujícím průchod buněčným cyklem patří checkpoint kinázy 1 a 2. V reakci na poškození DNA vyvolané odlišnými stimuly jsou checkpoint kinázy aktivovány zejména ATM kinázou, ale například v případě cisplatiny je aktivace těchto kináz na ATM nezávislá a Chk1 i Chk2 jsou aktivovány prostřednictvím kinázy ATR (Damia et al. 2001). Chk1 a Chk2 se jednak podílejí na stabilizaci proteinu p53, ale zejména inhibují funkci fosfatáz Cdc25A a Cdc25C zodpovědných za průchod přes G1/S a G2/M kontrolní body a zabraňují tak progresi buněk buněčným cyklem (Shapiro a Harper 1999). Chk2 hraje významnou roli v regulaci vstupu buněk z G1 do S fáze, její aktivace vede k fosforylaci fosfatázy Cdc25A, která se váže na protein 14-3-3 a degraduje (Falck et al. 2001). Degradovaná Cdc25A dále nemůže fosforylovat Cdk, a tak nemůže dojít k syntéze DNA. Chk1 a Chk2 také ovlivňují vstup buňky z G2 fáze do mitózy, v aktivované formě inhibují fosforylaci Cdc25C, bez níž nedochází k aktivaci komplexu Cdk1/cyklin B a k průchodu buněk do fáze mitózy (Lukas et al. 2001, Hirao et al. 2000, Khanna et al. 2001).

2.1.2.2 Reparace poškození

Zastavení buněčného cyklu, o němž je pojednáno výše, umožní buňce reparaci poškozené DNA. Jakým způsobem k opravě dochází? Reparace jednořetězcových poškození DNA je zprostředkována zejména tzv. reparací excizí bazí (BER) nebo nukleotidovou excizní reparací (NER). Pomocí BER jsou opravována místa s poškozenými bázemi. Klíčovým regulátorem jsou poly(ADP-ribose) polymerázy 1 a 2, které rozeznávají jednořetězcové zlomy DNA. Na procesu opravy se podílejí specifické DNA-glykosidázy, které odstřihují poškozené báze. Následně dochází ke štěpení řadou endonukleáz a doplnění správného nukleotidu prostřednictvím DNA polymerázy β .

Celý proces je ukončen zacelením řetězce pomocí DNA ligázy (Řezáčová a Vávrová 2011).

Reparace pomocí NER je komplexní děj zahrnující opravu lézí interakcí až 20 různých proteinů, přičemž ke klíčovým patří produkty genů *XP*. V procesu reparace dochází nejprve k rozeznání a vymezení deformovaného úseku DNA, následně k jeho vystřížení o délce 25-30 nukleotidů a na závěr k dosyntetizování vystříženého úseku DNA (de Laat et al. 1999).

Na reparaci dvojitých zlomů DNA se podílejí zejména dva mechanismy – nehomologní spojování konců (NHEJ) a homologní rekombinace (HR). NHEJ představuje hlavní reparační systém eukaryotických buněk, dochází k němu častěji než k HR a to v průběhu celého buněčného cyklu, ale především v G1 a časně S fázi (Ma et al. 2005). Při NHEJ často dochází ke změnám ve struktuře DNA, protože nelze správně rozeznat, které části zlomů mají být spolu spojeny. Nejdůležitějšími proteiny v procesu NHEJ jsou DNA-dependentní proteinkinázy (DNA-PKcs) s heterodimerickou subjednotkou Ku80 a Ku70, DNA ligáza IV a XRCC4 (Lieber et al. 2003). Na konce zlomu se nejprve naváže podjednotka Ku a aktivuje DNA-PKcs. Tímto procesem se vytvoří DNA-PK komplex regulující děje při NHEJ, úpravu konců zlomu, opravu zlomu a následnou ligaci (Řezáčová a Vávrová 2011).

Naproti tomu HR probíhá od pozdní S fáze do G2 fáze a je přesnější, k reparaci využívá homologní sekvenci DNA jako nepoškozenou matici. Zdá se, že role této reparační cesty je v lidských buňkách minoritní a její role spočívá zejména v kontrole a doopravení míst nepřesně spojených pomocí NHEJ. Klíčovými proteiny v procesu HR jsou Rad52, Rad51, XRCC2 a XRCC3 (Khanna et al. 2001).

2.1.2.3 Apoptóza

V zájmu zachování integrity organismu denně podléhají buněčné smrti milióny buněk. Fyziologicky tak dochází k odstraňování starých, nefunkčních nebo poškozených buněk. Buňky zanikají převážně apoptózou, která je dle současných poznatků definována jako konkrétní forma geneticky řízené buněčné smrti, která neindukuje destruktivní zánětlivou reakci (Krejsek et al. 2004). Pokud dojde v buňce k výraznému poškození a porušení energetické rovnováhy může dojít k buněčné smrti tzv. nekrózou, která se od apoptózy liší. Charakteristickým rysem nekrózy je dysfunkce buněčných a organelových membrán vedoucí ke ztrátě iontové homeostázy. Mitochondriální dýchání

je omezeno, buňkám se nedostává ATP a v důsledku toho se rozpadají. Buněčný obsah vylitý do okolí pak způsobí zánětlivou odpověď (Vávrová et al. 2002). Naproti tomu apoptotický proces je přísně regulovaný děj, kdy v buňce dochází k typickým morfologickým změnám, které jsou charakterizovány sraštěním buňky, kondenzací chromatinu, fragmentací jádra a vznikem apoptotických tělísek, které jsou *in vivo* v konečné fázi fagocytovány (Kerr et al. 1972).

Morfologické změny doprovázející apoptózu jsou dány aktivací kaspáz. Jedná se o cysteinové proteázy, které se přirozeně vyskytují v cytoplasmě. Jsou syntetizovány jako proenzymy a takto zůstávají inaktivní ve většině zdravých buněk. K jejich aktivaci dochází až po obdržení různých smrtících signálů, kdy se zformují v aktivní proteázy, jejichž hlavní funkcí je selektivní štěpení cílových substrátů. Kaspázy štěpí substráty přítomné jak v cytoplasmě, tak v buněčném jádře. Jedná se zejména o cytoskeletální struktury, regulační molekuly, biomembrány, jaderné enzymy a transportní proteiny. Jako příklad můžeme uvést β -aktin, lamin B, ICAD (inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease), PARP (poly-ADP ribose polymerase), proteiny zapojené do reparace DNA, spojování mRNA a replikace DNA (Thornberry a Lazebnik 1998).

Jakými signály jsou kaspázy aktivovány? K aktivaci kaspáz vedou dvě hlavní cesty: Vnější, která je aktivována po navázání ligandu na membránové receptory, a vnitřní, která je spouštěna signály z vnitřního prostředí buňky. Je-li apoptóza spouštěna vnější cestou, dochází k navázání ligandu na příslušný receptor smrti (např. CD95R (Fas-1R), TNFR1, TRAIL-R1 a R2, TRAMP) a vzniku buněčnou smrt navozujícího signalizačního komplexu (DISC – death inducing signaling complex). Následně přicházejí na řadu kaspázy, v případě vnější cesty aktivace iniciátorová kaspáza 8. Ta aktivuje další kaspázy, z nichž nejdůležitější jsou efektorové kaspázy 3 a 7, které jsou zodpovědné za rozvoj morfologických znaků apoptózy a vedou ke konečné apoptotické smrti buňky (Hale et al. 1996, Kinloch et al. 1999, Song and Steller 1999). Vnitřní cesta apoptózy, tzv. mitochondriální, je iniciována signály z vnitřního prostředí buňky, zejména v reakci na genotoxický stres. Mezi faktory spouštějící vnitřní apoptotickou dráhu patří např. cytostatika, ionizující záření, UV záření, reaktivní formy kyslíku, metabolické změny, viry, bakterie. V naší práci jsme sledovali indukci této cesty navozené působením cisplatiny a mitoxantronu. Po poškození DNA je vnitřní cesta apoptózy aktivována zejména fosforylací proteinu p53, který následně reguluje početnou skupinu proteinů z rodiny Bcl-2. Celá skupina proteinů Bcl-2 má více jak 20 členů, které rozdělujeme dle jejich protichůdné funkce na pro-apoptotické a proti-

apoptotické. V nepřítomnosti smrtícího signálu jsou pro-apoptotičtí členové rodiny Bcl-2 (Bax, Bam, Bim, Bid, Puma, Noxa) lokalizováni v cytoplazmě, zatímco proti-apoptotičtí členové (Bcl-2, BclxL, Mcl-1) na membránových strukturách mitochondrií, endoplasmatického retikula a jaderné membrány. Přijme-li buňka v důsledku poškození DNA signál, pro- a proti-apoptotičtí členové se setkají na povrchu mitochondrií, kde regulují uvolnění cytochromu c z mitochondrií (Liu et al. 1996). Poměr těchto dvou protichůdných členů určuje, zda-li buňka podlehně apoptotickému procesu či nikoliv. Převáží-li pro-apoptotičtí členové, zprostředkují uvolnění cytochromu c z mitochondrií. Následně cytochrom c vytvoří komplex s Apaf-1 (Apoptotic protease-activating factor-1) a prokaspázou 9, tzv. apoptosom, který aktivuje nejvýznamnější efektorové kaspázy 3 a 7. Jak již bylo uvedeno, tyto kaspázy jsou zodpovědné za vlastní apoptotický proces (Hill et al. 2004). Bylo zjištěno, že na apoptotickém procesu se také podílí inhibitor Cdk, protein p21^{WAF1/Cip1}. Svoji vazbou na prokaspázu 3 brání aktivaci hlavní efektorové kaspázy a může tak blokovat vnější i vnitřní cestu buněčné smrti (Cazzalini et al. 2010).

Dalším proteinem, který může po poškození DNA zprostředkovávat apoptózu, je protein p73, který je svoji konfigurací i funkcí podobný proteinu p53. Tento protein se vyskytuje ve třech izoformách α , β a γ , které jsou různou měrou schopny indukovat apoptózu. Protein p73 je aktivován pomocí c-Abl tyrosin kinázy a je schopen spustit apoptotický proces v buňkách s chybějícím proteinem p53. Aktivace p73 v nádorových liniích může indukovat expresi genů jako jsou p21^{WAF1/Cip1}, Bax, Mdm2 a Gadd45. K indukci apoptózy je nutná také přítomnost rozeznávacích proteinů (MMR, HMG1). Studie na mezenchymálních kmenových buňkách izolovaných z kostní dřeně ukazuje, že protein p73 hraje v buněčné chemosenzitivitě důležitou roli. Zvýšená exprese proteinu p73 vedla například u buněk vystavených působení cisplatiny ke zvýšené apoptóze. Protein p73 podobně jako protein p53, spouští buněčnou smrt prostřednictvím aktivace pro-apoptotických členů rodiny Bcl-2 - Puma a Bax (Melino et al. 2004).

2.1.2.4 Senescence

Typickou odpovědí většiny somatických buněk na nereparovatelné poškození DNA vyvolané genotoxickým stresem je indukce apoptózy, ovšem mnohé studie ukazují, že u některých typů buněk tomu tak není. V některých buněčných typech

dochází k permanentní zástavě buněčného cyklu, tzv. předčasné senescenci, kdy buňky ztrácí schopnost proliferace (Bischof et al. 2009).

Fenomén buněčné senescence byl prvně popsán Hayflickem a Moorheadem u lidských fibroblastů v roce 1961. Senescentní buňky jsou permanentně uvězněny v bloku buněčného cyklu a neproliferují. Senescence může být spouštěna buď zkrácením telomer (telomerická senescence) nebo různými formami buněčného stresu (netelomerická senescence). Primární příčinou senescence v normálních lidských buňkách je senescence telomerická nebo tzv. replikativní. Počet buněčných dělení zdravé somatické buňky je geneticky omezen a činí asi 50 buněčných cyklů. Jelikož DNA polymeráza není schopna z prostorových důvodů replikovat lineární molekuly DNA až do konce templátové molekuly DNA, jsou u eukaryotních buněk na konci chromozomů přítomny speciální nekódující struktury – telomery. Telomery jsou krátké opakující se sekvence nukleotidů, u člověka je to TTAGGG, které se opakují v počtu 500 až 2000. Hlavní funkcí těchto sekvencí spolu s navázanými proteiny je ochrana chromozomů před působením nukleáz a ligáz. Při každé replikaci DNA u zdravých somatických buněk dochází ke zkrácení telomerových opakování o 50 až 200 párů bazí. Délku telomer udržuje enzym telomeráza, respektive katalytická podjednotka telomerázy spolu s RNA komponentou. V buňkách s neaktivní telomerázou nedochází při replikaci DNA k dosyntetizování ztracených telomerových úseků a v okamžiku, kdy jsou telomery zkráceny natolik, že hrozí poškození kódujících úseků DNA, dojde k trvalé zástavě buněčného cyklu, tzv. replikativní senescenci. Telomeráza je fyziologicky aktivní pouze v období maximální proliferativní aktivity v průběhu embryonálního vývoje, nikoliv u většiny zdravých somatických buněk v dospělosti. Menšinu, kde je exprimována telomeráza zaručující buněčnou imortalitu u dospělých somatických buněk, tvoří právě buňky kmenové. Dalším příkladem jsou buňky nádorové. V průběhu maligní transformace dochází k reaktivaci telomerázy, kdy se proces zkracování telomer zastaví a buňky získají nesmrtelnost. Můžeme konstatovat, že kriticky krátké telomery jsou jistou formou poškození DNA, které v buňce aktivují molekulární mechanismy vedoucí k senescenci, která tak za fyziologických okolností slouží k ochraně organismu (Peters et al. 2005).

Telomerická senescence není zdaleka jediným mechanismem ochrany organismu před signály, které mohou vést k maligní transformaci nebo jiným onemocněním plynoucím z chybné replikace DNA. Jak bylo zmíněno výše, v reakci na různé stresové stimuly může být v buňkách navozena také tzv. netelomerická senescence.

Netelomerické senescenci se také jinak říká urychlená nebo stresem indukovaná předčasná senescence (SIPS – stress induced premature senescence).

Charakteristickým rysem senescentních buněk je trvalá zástava v některé z fází buněčného cyklu. Buňky jsou metabolicky aktivní, ale neproliferují. V jaké fázi buněčného cyklu jsou buňky zastaveny závisí zejména na druhu genotoxického agens a typu buňky. V některých studiích byl pozorován blok v G1 fázi, v jiných v S nebo G2/M fázi (Campisi a Fagagna 2007). Senescentní buňky také vykazují některé typické morfologické rysy lehce pozorovatelné *in vitro*. U buněk dochází ke změně tvaru, k jejich zploštění, zvětšení a vzrůstu granularity v cytoplazmě. Dalším znakem SIPS je nárůst množství β -galaktosidázy v buňce. Tento jev je dnes nejčastěji používaným markerem SIPS. Zvýšení aktivity β -galaktosidázy je stanovováno při pH 6 a je vysoce specifické pro senescentní buňky. U normálních nesenescenčních buněk není její zvýšená aktivita při pH 6 detekovatelná (Dimri 1995).

Jaké signální dráhy jsou zodpovědné za navození SIPS? I na procesu trvalé zástavy buněčného cyklu se podílí protein p53, jehož hlavní úlohou v procesu SIPS je aktivace inhibitoru Cdk2 a Cdk4, proteinu p21^{WAF1/Cip1}. Navození SIPS je ovšem doprovázeno také aktivací dalších inhibitorů Cdk, z nichž nejvýznamnější roli hraje protein p16^{INK4a}, inhibitor Cdk4 a Cdk6. Přesný mechanismus indukce exprese genu pro protein p16^{INK4a} není zcela znám. Protein p16^{INK4a} může být aktivován vlivem poškození DNA dvojitými zlomy, oxidačním stresem nebo například některými ze signálních drah mitogeny aktivovaných proteinkináz (ERK1/2 nebo p38) (Vávrová a Řezáčová 2009).

Proteiny p21^{WAF1/Cip1} a p16^{INK4a} se podílejí na udržení trvalé zástavy buněčného cyklu zejména řízením důležitého regulátoru buněčného cyklu – proteinu Rb. Protein p16^{INK4a} specificky inhibuje komplexy Cdk4, Cdk6 s cyklinem D, které udržují Rb protein v hypofosforylovaném, tedy inaktivním stavu, a brání tak průchodu buněčným cyklem. O regulaci Rb proteinu pomocí Cdk inhibitorů je blíže pojednáno v kapitole o buněčném cyklu. Protein p21^{WAF1/Cip1} a p16^{INK4a} během senescence spolupracují na udržení hypofosforylované formy Rb proteinu. Bylo zjištěno, že buňky s nízkým množstvím p16^{INK4a} zpravidla mohou po inaktivaci cesty p53-p21^{WAF1/Cip1} obnovit proliferaci, zatímco buňky s vysokým množstvím tohoto proteinu trvale ztrácí proliferační kapacitu a proliferace již cestou inaktivace p53-p21^{WAF1/Cip1} nemůže být obnovena. Zdá se, že protein p21^{WAF1/Cip1} udržuje hypofosforylovanou formu Rb

zpočátku a dočasně, zatímco protein p16^{INK4a} zajišťuje permanentní hypofosforylaci Rb, a prakticky tak činí senescenci nevratnou (Beausejour et al. 2003).

Jaká je role SIPS v tumorigenezi? V mnoha studiích bylo dokázáno, že SIPS může být navozena zejména různými druhy záření a chemoterapeutiky. SIPS pak v reakci na poškození DNA slouží jako jeden z mechanismů ochrany organismu před signály, které mohou vést k maligní transformaci nebo jiným onemocněním plynoucím z chybné replikace DNA. Na druhou stranu je stále předmětem bádání, jakým mechanismem u zdravých somatických buněk mohou chemoterapeutika či jiné genotoxické stresory navozující senescenci naopak tumorigenezi či jiné onemocnění plynoucí z genomové nestability zapříčinit. Jelikož celkem častou příčinou selhání terapie u nádorových buněk je rezistence k cytostatikům navozujícím apoptózu, navození senescence by tak v některých případech mohlo sloužit jako záloha vedoucí k zastavení růstu nádorových buněk. Jelikož jsou v terapii senescenci způsobujícím agens vystavovány i buňky zdravé, je důležité objasnit i reakce v nich probíhající. Ačkoli indukce senescence u nádorových buněk nevede k další podpoře tumorigeneze, u zdravých somatických buněk je možný opačný efekt stále předmětem výzkumu (Dimri 2005). Nezávisle na poškození DNA může být SIPS vyvolána také vlivem oxidativního stresu, například při změněných kultivačních podmínkách, kdy se buňkám nedostává dostatečné množství kyslíku, nebo po působení peroxidu vodíku (von Zglinicki et al. 2005).

2.2 Kmenové buňky

Kmenové buňky jsou speciální typy buněk, které podle původu můžeme rozdělit na embryonální a adultní (somatické). V lidském organismu vznikají záhy po oplodnění vajíčka, kdy po několika děleních zygoty získávají buňky, tzv. blastomery, unikátní schopnost sebeobnovy a diferenciaci v jakýkoliv typ buněk (tzv. totipotence). V průběhu dalšího dělení embryonálních buněk se postupně snižuje jejich diferenciací potenciál, ve stádiu blastocysty jsou buňky pluripotentní, stále si zachovávají širokou diferenciací schopnost a mohou se diferencovat na buňky všech tří zárodečných typů (mezoderm, ektoderm, entoderm).

S vyžráváním tkání dochází k dalšímu zúžení schopnosti kmenových buněk měnit se v různé typy buněk a ve vyvíjejících se tkáních jsou již přítomny multipotentní tkáňově specifické kmenové buňky, které jsou za normálních okolností schopny

diferenciace pouze v rámci patřičné tkáně. U dospělého jedince se tyto buňky vyskytují v mnoha tkáních. Rozeznáváme například kmenové buňky hematopoetické, gastrointestinální, epidermální, jaterní, mezenchymální nebo nervové.

Adultní kmenová buňka je tedy determinována tkání, ve které vzniká a je schopna jak sebeobnovy, tak diferenciace až na zralou buňku (Masopust 2008). Multipotentní progenitorové buňky nejsou výhradně tkáňově specifické, ale jsou schopny za určitých specifických podmínek diferencovat v buňky odlišné (tzv. plasticita kmenových buněk). Během vývoje a růstu organismu jsou kmenové buňky početně převýšeny diferenciovánými buňkami vykonávajícími specializované funkce. Odhaduje se, že u dospělého jedince připadá přibližně 1 buňka kmenová na 10 000 diferencovaných (Friedenstein et al. 1982). Kmenové buňky přetrvávají ve tkáních po celou dobu lidského života a svojí morfologií i vlastnostmi se liší od buněk specializovaných. Podobají se spíše buňkám nevyzrálým, mají vysoký nukleocytoplazmatický poměr, vysokou flexibilitu membrán a chybí jim znaky buněk diferencovaných. V organismu kmenové buňky sídlí ve speciálním tkáňovém mikroprostředí, tzv. niché, které reguluje jejich buněčný osud. Niché vytvářejí různé okolní buňky a struktury, které udržují kmenové buňky v klidovém stavu, zajišťují výživu a mohou ovlivňovat biochemické pochody při samoobnově a diferenciaci (Masopust 2008).

Hlavní funkcí adultních kmenových buněk je udržování tkáňové homeostázy a stavby jednotlivých tkání v průběhu života. Za normálních okolností se kmenové buňky ve tkáních vyskytují v klidovém stavu a vykazují minimální metabolismus, což přispívá k jejich vyšší odolnosti vůči škodlivým faktorům. K aktivaci kmenových buněk dochází až po obdržení patřičných stimulů po poškození či ztrátě diferenciovanych buněk. Kmenové buňky se začnou dělit, přičemž z jedné mateřské buňky může vzniknout jednak kopie původní kmenové buňky a jednak progenitorová buňka, která se dále diferencuje a nahrazuje tak buňky ztracené. Po obnovení původního fyziologického stavu kmenové buňky opět přecházejí do klidového stádia. Kmenové buňky se tak mohou dělit jak symetricky, kdy vznikají dvě identické kopie, tak asymetricky, kdy ze sesterské buňky vzniká buňka specializovaná. Kapacita sebeobnovy kmenových buněk přesahuje mez buněčného dělení, tzv. Hayflickův limit, kdy jsou buňky schopny proliferovat více jak 50-krát (Suchánek et al. 2007).

Je známo, že i nádory obsahují tzv. nádorové kmenové buňky, které mají schopnost sebeobnovy a rozsáhlý proliferační i diferenciální potenciál. Rakovinné

buňky s obdobnými vlastnostmi jako buňky kmenové již byly popsány u akutní i chronické myeloidní leukémie, u některých forem akutní lymfoidní leukémie, u nádorů prsu či mozku (Bjerkvig et al. 2009, Jordan 2004). Dále byly nalezeny i u nádorů plic, kosti, prostaty a melanomu (Tysnes a Bjerkvig 2007). Původ těchto kmenových nádorových buněk není stále objasněn. Mohou pocházet z rezervoáru původních kmenových buněk, progenitorových buněk nebo buněk procházejících dediferenciačním procesem. Námi zjištěné informace o regulaci signálních cest po poškození DNA cytostatiky by tudíž v budoucnu mohly přispět k vývoji cílené eradikace právě nádorových kmenových buněk.

2.2.1 Mezenchymální kmenové buňky zubní pulpy

Mezenchymální kmenové buňky (MKB) jsou buňky sídlící prakticky ve všech tkáních lidského těla, například v trámčině kostní dřeně, játrech, plicích, ledvinách, kosterních svalech, zubní pulpě a tukové tkáni. MKB byly také izolovány z periferní krve, pupečnickové krve a synoviálních membrán (Kassem et al. 2004). MKB představují významný zdroj tkáňově specifických kmenových buněk, které by mohly být využity pro reparaci, regeneraci nebo rekonstituci specifických tkání. Jedním z problémů jejich terapeutického využití je jejich dostupnost. Většina tkání nemůže být vzhledem k poměru odebrané tkáně a počtu MKB v ní vhodným zdrojem (Porada a Almeida-Porada 2010).

V naší práci jsme se zabývali mezenchymálními kmenovými buňkami izolovanými ze zubní pulpy (KBZP). Zubní pulpa je bohatě vaskularizovaná a inervovaná tkáň vyplňující dutinu korunky a dřeňový kanálek zubu, zachovává si jedinečnou histologickou strukturu a nichi a představuje snadno dostupný zdroj autologních tkáňově specifických MKB, které by mohly být terapeuticky využity v mnoha medicínských oborech. KBZP prvně izolovali v roce 2000 Gronthos et al. a v pozdějších experimentech prokázali jejich schopnost diferenciaci v různé buněčné typy a jejich schopnost sebeobnovy. Také Suchánek et al. v roce 2007 izolovali a kultivovali KBZP, zkoumali jejich biologické vlastnosti a porovnávali je s vlastnostmi MKB kostní dřeně. Zjistili, že izolované KBZP jsou homogenní populací kmenových buněk schopných sebeobnovy s obdobnou charakteristikou jako MKB kostní dřeně, mají schopnost proliferovat i přes Hayflickův limit a jejich karyotyp zůstává i v dalších pasážích nezměněný. KBZP vykazují široký diferenciací potenciál, jsou schopny

diferenciace v odontoblasty, adipocyty, chondrocyty, osteoblasty a v buňky neurální (Gronthos et al. 2000, 2002, Arthur et al. 2008, Kerkis et al. 2006, Yalvac et al. 2010). Mezi charakteristické znaky KBZP patří $CD29^+$ $CD44^+$ $CD73^+$ $CD90^+$ $CD166^+$ $CD184^+$ $Bcrp1^+$ $Musashi-1^+$ $Nanog^+$ $Sox-2^+$ (Karbanová et al. 2011).

2.2.2 Odpověď kmenových buněk na genotoxický stres

Jak již bylo uvedeno, zda-li v buňce po poškození DNA dojde k indukci apoptózy nebo k předčasné senescenci závisí na mnoha faktorech, ale zejména na buněčném typu. U hematopoetických kmenových buněk (HKB) je reakce na poškození DNA poměrně dobře prostudována. Vávrová et al. v roce 2002 studovali mechanismy, jakými reagují kmenové buňky krvetvorby na dvojité zlomy DNA vyvolané ionizujícím zářením. Zatímco jednoduché zlomy DNA jsou rychle reparovány, oprava DSBs je pro buňku komplikovaná a poškození DNA je často letální. Nedokonalá reparace DSBs pak způsobuje mutace a vede ke genomové nestabilitě, nejčastěji ke chromosomovým aberacím, inter- a intra-chromosomálním přestavbám. Jestliže nedojde k opravě poškozených buněk, HKB jsou odstraněny převážně apoptózou. Hematopoetické kmenové buňky ($CD133^+$) izolované z periferní krve zdravých dárců jsou velmi radiosenzitivní a již dávka 2,5 Gy vedla u 80 % k indukci apoptózy, přičemž 20 % buněk zůstávalo permanentně v G2 a S bloku buněčného cyklu a neproliferovaly (Vávrová et al. 2002). Podobně Meng et al. 2003 studovali mechanismus účinku ionizujícího záření na myší hematopoetické kmenové buňky, kde dávka 4 Gy vedla k 95% proliferační inhibici a indukci apoptózy. Zatímco většina diferencovaných hematopoetických buněk umírá po v reakci na poškození DNA apoptózou, u buněk mezenchymálního původu převažuje indukce senescence (Dimri et al. 2005, Probin et al. 2007, Serakinci et al. 2007, Muthná et al. 2010).

Serakinci et al. 2007 studovali vliv ionizujícího záření na MKB izolovaných z kostní dřeně. Prokázali, že *in vitro* ozáření v dávkách 2,5-15 Gy vedlo k zástavě jejich růstu, avšak ani nejvyšší dávka nevyvolala buněčnou smrt. Po dávce 10 a 15 Gy se buňky nedělily, ale ani nebyly eradikovány, a to ani za 3 měsíce. Již 10. den po ozáření studovanými dávkami prokázali u více než 90 % buněk senescenci. Mezenchymální kmenové buňky izolované z kostní dřeně tedy neumírají po ozáření apoptózou, a to ani po vysokých dávkách, ale pouze ztrácejí svou schopnost proliferovat. I u KBZP po ozáření vysokou dávkou (20 Gy) γ záření nedochází k apoptóze, ale k zástavě

buněčného cyklu a k aktivaci mechanismů vedoucí k SIPS. Po ozáření dávkami 6 a 20 Gy stoupá u KBZP aktivita β -galaktosidázy a dochází k vzestupu dalšího markeru senescence – proteinu p16^{INK4a} (Muthná et al. 2010). Stejným mechanismem reagují na vysoké dávky ionizujícího záření také MKB izolované z periodontálního ligamenta a z kostní dřeně (Ćmielová et al. 2012). Chen et al. 2006 ve své práci na MKB z kostní dřeně dokazují po ozáření γ zářením také indukci SIPS, ovšem nárůst aktivity β -galaktosidázy v průběhu experimentu nepozorují. Naproti tomu Schönmeyr et al. 2008 ve své studii na krysích MKB izolovaných z kostní dřeně dokazují SIPS a vzestup aktivity β -galaktosidázy detekují.

Přesto, že většina MKB reaguje na ionizující záření indukci SIPS, byla u MKB detekována také apoptóza. Lan et al. 2012 prokázali, že lidské embryonální kmenové buňky reagují na DSBs způsobené ozářením dávkou 5 Gy navozením apoptotického procesu a u zbylých přeživších buněk dochází k dočasné zástavě buněčného cyklu umožňující reparaci poškozené DNA.

2.3 Cytostatika

Cisplatina (CP) a mitoxantron (MTX) se v léčbě karcinomů využívají zejména díky jejich schopnosti navozovat v tumorových buňkách apoptózu. Z předchozích výzkumů je zřejmé, že některé buněčné typy reagují na poškození DNA cytostatiky nikoliv apoptózou, ale navozením senescence. CP a MTX působí na buňku odlišnými mechanismy. Zatímco CP je řazena k alkylačním cytostatikům, která poškozují DNA převážně tvorbou kroslinků, MTX náleží do skupiny inhibitorů topoizomerázy II, které v buňce způsobují vznik DSBs. Jakým způsobem reagují buňky na léčbu těmito cytostatiky? V následujících kapitolách jsou popsány mechanismy účinku CP a MTX a stručně uvedeny signální dráhy aktivované po jejich aplikaci.

2.3.1 Cisplatina

Cisplatina je v klinické praxi využívána v léčbě řady karcinomů, zejména karcinomů varlat, ovaria, hlavy, krku, močového měchýře a malobuněčného karcinomu plic. Jedná se o celkem jednoduchou anorganickou sloučeninu – $\text{cis}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$, tedy *cis*-diamindichloroplatnatý komplex, řadící se mezi tzv. alkylační cytostatika. Hlavní mechanismus protinádorového účinku cisplatiny spočívá v její interakci s DNA a v tvorbě kovalentních vazeb mezi cytostatikem a purinovými bázemi, nejčastěji

s guaninem. To má za následek vznik zejména vnitrořetězcových a v menší míře meziřetězcových kroslinků. Vzniklé kovalentní vazby mezi řetězci brání jejich separaci při replikaci a zároveň dochází k inhibici transkripce (Siddik 2003).

Přesto, že je cisplatina jedním z nejčastěji používaných cytostatik, její použití je limitováno zejména rozvojem rezistence nádorových buněk a také vedlejšími účinky na organismus, převážně nefrotoxicitou a neurotoxicitou (Jiang a Dong 2008). Rezistence buněk k cisplatině je podmíněna řadou mechanismů, které přispívají k zabránění akumulace poškození DNA, jako je snížené vychytávání nebo zvýšené vylučování cytostatika buňkou, inaktivace prostřednictvím intracelulárních thiolů (např. glutathionu) a v neposlední řadě zvýšenou schopností buňky reparovat poškození a sníženou schopností podléhat apoptotickému procesu (Chu 1994).

Po expozici CP dochází u většiny buněčných linií k indukci apoptózy, a to zejména prostřednictvím proteinu p53. Nicméně tento tumorový supresor není vždy za spuštění apoptotického procesu zodpovědný a v některých případech může působit i protektivně (Fan et al. 1995, Konstantskou et al. 2009). Protein p53 je po cisplatinou vyvolaném poškození DNA fosforylován kinázou ATR. Aktivovaný p53 u většiny buněčných typů spouští vnější apoptotickou dráhu iniciovanou kaspázou 9 (Kuwahara et al. 2000, Mueller et al. 2003). U některých buněčných linií se ovšem na apoptotickém procesu podílí i vnější signální dráha zprostředkována přes receptory smrti (Konstantskou et al. 2009).

Kromě proteinu p53 je dalším cílem ATR kinázy aktivace checkpoint kináz Chk1 a Chk2 (Damia et al. 2001). Pro většinu buněčných linií vystavených působení cisplatiny je charakteristická zástava buněčného cyklu v G2 fázi, významná akumulace buněk v G1 fázi se vyskytuje velmi zřídka (Sorenson a Eastman 1988, Zhao et al. 2004). U některých buněčných linií je ATR kináza také zodpovědná za aktivaci MAPK (ERK1/2, JNK a p38) (Bae et al. 2006).

Přesto, že převažujícím typem odpovědi buněk na terapii cisplatinou je indukce apoptotického procesu, u některých buněčných linií byla také prokázána SIPS (Zhao et al. 2004). Reakce různých buněčných typů na terapii cisplatinou jsou podrobněji diskutovány v kontextu našich výsledků.

2.3.2 Mitoxantron

Mitoxantron je syntetický derivát antracendionu, který vykazuje převážně interkalační účinky. Interkalace spočívá v navázání cytostatika vodíkovými vazbami na DNA. Výsledkem tvorby stabilního komplexu s DNA je inhibice replikace a transkripce a dochází ke zlomům vláken. V terapeutických koncentracích však hraje zásadní roli inhibice topoisomerázy II. Tento enzym se váže na oba řetězce dvoušroubovice DNA, postupně je přeruší, uvolní nadšroubovici a následně DNA opět spojí. MTX vytváří v buňce s topoisomerázou II kovalentní komplex, čímž zabraňuje zpětnému spojení DNA a indukuje tak vznik permanentních dvojítych zlomů – DSBs (Ehninger et al. 1990).

V klinické praxi je mitoxantron užíván k léčbě karcinomu prsu, vaječníků a akutní myeloblastické leukémie (v kombinaci s cytarabinem). Dále se indikuje jako cytostatikum druhé volby u Hodgkinovy choroby a nehodgkinských lymfomů. Doplňkovým lékem může být též u sarkomů měkkých tkání, u mezoteliomu, karcinomu žaludku, u malobuněčného karcinomu plic a u karcinomu močového měchýře (Klener 1996). MTX je navíc v současné době používán při léčbě roztroušené sklerózy. Působí jako imunosupresor, inhibuje aktivaci T lymfocytů a proliferaci T a B lymfocytů, snižuje produkci protilátek a inaktivuje makrofágy. Je indikován u sekundárně progresivní a relapsující-progresivní roztroušené sklerózy (Fox 2006).

Je známo, že v reakci na DSBs indukované MTX dochází v buňce k souběžné aktivaci mnoha signálních drah, k nimž patří například dráhy proteinu p53, MAPK a checkpoint kináz. Některé buněčné linie reagují na MTX indukci apoptózy (Bhalla et al. 1993, Bellosillo et al. 1998, Ray et al. 1994, Boland et al. 2000, Kluza et al. 2004, Flaig et al. 2007, Seifrtová et al. 2011), zatímco u jiných dochází k navození SIPS (Chang et al. 1999, te Poele et al. 2002). Z hlediska buněčného cyklu patří MTX mezi nespecifická cytostatika, s určitou převahou inhibice ve fázi G2. Stejně jako po působení jiných genotoxických agens, výsledná reakce buněk na MTX silně závisí na buněčném typu. V diskuzi jsou tyto faktory rozebrány z hlediska různých buněčných typů a porovnány s výsledky námi zjištěné odpovědi KBZP a dermálních fibroblastů.

3 CÍLE PRÁCE

Cílem této práce bylo charakterizovat reakci mezenchymálních kmenových buněk izolovaných ze zubní pulpy (KBZP) vůči cytostatikům cisplatině a mitoxantronu a porovnat ji s odpovědí normálních dermálních fibroblastů (DF). Hlavními úkoly bylo zjistit:

- Jakým způsobem reagují mezenchymální KBZP na poškození DNA vyvolané alkylačním cytostatikem cisplatinou?
- Liší se reakce KBZP na terapii cisplatinou od reakce DF?
- Jaká je odpověď KBZP na mitoxantronem vyvolané poškození DNA? Je rozdílná od DF?
- Zda a jaké dávky cytostatik indukují u KBZP a DF apoptózu?
- Dochází po působení těchto cytostatik u KBZP k přechodné zástavě buněčného cyklu nebo k navození senescence?

4 MATERIÁL A METODIKY

4.1 Buněčné kultury a kultivační podmínky

4.1.1 Kmenové buňky zubní pulpy

Kmenové buňky zubní pulpy (KBZP) nám byly poskytnuty Ústavem histologie a embryologie Lékařské fakulty v Hradci Králové. Tyto buňky byly získány od pacientů, kteří podepsali informovaný souhlas podle Etické komise Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice v Hradci Králové. KBZP byly izolovány z třetích molárů extrahovaných z ortodontických důvodů. Zuby byly extrahovány ve sterilních podmínkách a rovněž za sterilních podmínek dopraveny do laboratoře tkáňových kultur. Ze zubů byla vyextrahována zubní pulpa, a následně vystavena působení enzymů kolagenázy (Sevapharma, Česká Republika) a dispázy (Invitrogen, USA) po dobu 70 minut. Po následné centrifugaci (600 G, 5 min) byla získána peleta buněk. KBZP byly získány na základě imunofenotypizace – pozitivita pro CD29, CD44, CD90 a HLA I (Suchánek et al 2007, 2009).

KBZP byly kultivovány v médiu pro mezenchymální kmenové buňky o složení alfa MEM (Invitrogen, USA), 2% FCS (fetální telecí sérum) (PAA, USA), 10 ng/ml EGF, 10 ng/ml PDGF (PeproTech, USA), L-askorbová kyselina (Sigma, USA), 2% glutamin, penicilin/streptomycin, gentamycin (Invitrogen, USA), 50 nmol/l dexamethason (Sigma, USA) a inkubovány při 37 °C a kontrolované atmosféře 5% CO₂. Zpočátku byly buňky kultivovány 5-7 dní v kultivačních lahvích se povrchem Cell⁺ surface[®] (Sarstedt, USA). Po této době byly malé kolonie pomocí trypsin-EDTA (Invitrogen, USA) přesazeny do standardních kultivačních lahví (NUNC, Dánsko). Další pasáže následovaly vždy po dosažení 70% konfluency, přičemž s každou pasáží byla kontrolována morfologie a viabilita. Z důvodu kvality buněčné linie byly v 1., 3., 7. a 11. pasáži kontrolovány fenotypové charakteristiky (CD45, CD29, CD44, CD73, CD90, CD166), v 0., 2., 5., 7., 10. pasáži byla měřena délka telomer a v 5. a 10. pasáži byl kontrolován karyotyp. V průběhu kultivace nebyly pozorovány žádné signifikantní změny těchto parametrů. Podrobně jsou metody izolace, kultivace a charakterizace KBZP popsány v publikovaných článcích (Suchánek et al. 2007, 2009, 2010, Karbanová

et al. 2011). Ve všech provedených experimentech v této práci byly použity buňky z časných pasáží (3-9).

4.1.2 Lidské dermální fibroblasty

Lidské dermální fibroblasty byly zakoupeny od firmy PromoCell (Heidelberg, Německo). Kožní fibroblasty byly výrobcem izolovány z lidské předkožky mladistvých. Buňky byly kultivovány v kontrolované atmosféře 5% CO₂ při 37 °C v kultivačním médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) (Invitrogen, USA) obohaceném o 10% fetální telecí serum (PAA, USA), penicilin, streptomycin a glutamin (vše od Invitrogen, USA). Buňky byly pravidelně pasážovány po dosažení 70% konfluence pomocí trypsin-EDTA (Sigma, USA). Pro kontrolu viability a proliferace byly buňky při každé pasáži po obarvení trypanovou modří počítány v Bürkerově komůrce. Všechny experimenty byly provedeny s buňkami z časných pasáží (<12).

4.2 Cytostatika

V experimentech se pracovalo s cytostatiky cisplatinou (*cis*-diamindichloroplatnatý komplex) (Sigma-Aldrich, USA) a mitoxantronem (Sigma-Aldrich, USA). Zásobní roztok cisplatiny (CP) o koncentraci 1 mmol/l byl připraven rozpuštěním 3 mg CP v 10 ml kultivačního média. Před každým experimentem byl připraven čerstvý zásobní roztok, který byl dále ředěn kompletním médiem na požadované koncentrace. V případě CP byly buňky vystavovány koncentracím v rozmezí od 2 do 60 μmol/l dle charakteru experimentu.

Zásobní roztok mitoxantronu (MTX) o koncentraci 1 mmol/l byl připraven rozpuštěním 1,3 mg MTX ve 2,5 ml sterilní vody a skladován v mrazicím boxu při -20 °C. Před použitím byl roztok rozmražen a naředěn tak, aby byly buňky vystavovány koncentracím MTX v rozmezí od 5 do 150 nmol/l dle charakteru prováděného experimentu.

4.3 Stanovení cytotoxicity

Ke zjištění cytotoxického efektu cytostatik byl použit WST-1 test (Roche, Německo), který umožňuje spektrofotometricky stanovit chemosenzitivitu buněčných populací v 96 jamkové destičce (Sigma, USA). Do jedné jamky bylo nasazováno 3 x 10³

buněk ve 150 µl kultivačního média a destičky byly inkubovány při 37 °C v kontrolované atmosféře 5% CO₂. Následně bylo za 24 hodin přidáno cytostatikum v požadované koncentraci, za dalších 24 či 72 hodin bylo do každé jamky přidáno 50 µl WST-1 činidla. Po 3 hodinách inkubace bylo provedeno výsledné měření absorbance na spektrofotometru Tecan Infinite M200 (Tecan Group, Švýcarsko) při vlnové délce 440 nm a referenční vlnové délce 690 nm. Z naměřených dat byly určeny optimální koncentrace pro realizaci dalších experimentů.

4.4 Stanovení proliferace

Proliferace a procentuální zastoupení živých buněk bylo zjišťováno po jejich zpasážování pomocí 0,05% trypsin-EDTA (Invitrogen, USA). Stanovení proliferace bylo provedeno pomocí přístroje Z2 Counter (Beckman Coulter, USA) a procenta živých buněk pomocí Vi-Cell XR 2.03 (Beckman Coulter, USA) za použití barvení trypanovou modří.

4.5 Analýza buněčného cyklu

Zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu a možné procento apoptotických buněk v populaci bylo detekováno pomocí flow-cytometrického měření obsahu DNA. Před vlastní analýzou bylo přibližně 1×10^6 buněk v suspenzi dvakrát promyto ledovým fosfátovým pufrům (PBS) a permeabilizováno v 70% ethanolu minimálně po dobu 1 hodiny při 4 °C. Po odstranění ethanolu centrifugací byly buňky dvakrát promyty v PBS a inkubovány 5 minut v citrátovém pufru (192 ml 0,2 mol/l Na₂HPO₄ + 8 ml 0,1 mol/l kyselina citrónová, pH = 7,8) pro extrakci nízkomolekulárních fragmentů DNA. Následně byly buňky značeny propidium jodidem pomocí Vindelova roztoku (1ml 1 mol Tris, pH=8, 1 mg RNázy, 100 µl Triton X-100, 60 mg NaCl, 5 mg propidium jodidu a destilovaná voda do 100 ml) po dobu 60 minut při 37 °C. Po inkubaci byl obsah DNA změřen na průtokovém cytometru BD FACS Aria III (Becton, Dickinson and Company, USA) použitím 13 mW Coherent® Sapphire™ laseru s excitací při 488 nm nebo CyAn™ ADP (Becton, Dickinson and Company, USA). Data byla analyzována použitím softwaru BD FACS Diva 6.1.3. software (Becton, Dickinson and Company, USA), Summit v4.3 (Beckman Coulter, USA) nebo Multicycle AV (Phoenix Flow systems, USA). K odstranění dubletů a

vícenásobných multipletů při analýze DNA průtokovou cytometrií byl použit soubor opatření, které měly zamezit výskytu těchto buněčných artefaktů ve vlastním analyzovaném vzorku. Pomocí barevné vícenásobné gating analýzy byly vyřazeny agregáty s vysokou šířkou pulsu a barevně označené buňky s vysokými hodnotami FSC a SSC. Při analýze programem Multicycle AV (Phoenix Flow Systems, USA) byl vytvořen histogram šířky pulsu (*pulse width*) signálu versus jeho plocha (*area*) pro fluorescenční signál propidium jodidu v námi analyzovaném fluorescenčním kanálu.

4.6 Měření aktivity kaspáz

Aktivita kaspáz byla stanovena pomocí kitu Caspase-Glo Assays (Promega, Madison, WI, USA) v 96 jamkové destičce (Sigma, USA). Do jedné jamky bylo nasazováno 1×10^4 buněk v 50 μ l kultivačního média. Destičky byly inkubovány při 37 °C v kontrolované atmosféře 5% CO₂ po dobu 72 hodin. Poté bylo dle pokynů výrobce do každé jamky přidáno 50 μ l Caspase-Glo Assays reagentu a po 30 minutách inkubace bylo provedeno výsledné měření luminiscence na spektrofotometru Tecan Infinite M200 (Tecan Group, Švýcarsko).

4.7 Elektroforéza a Western blotting

K detekci specifických proteinů byly nejprve připraveny celobuněčné lyzáty podle pokynů výrobce (Cell lysis buffer, Cell Signaling Technology, USA). Celkové množství proteinů v jednom vzorku bylo stanoveno pomocí BCA assay (roztok CuSO₄:roztok bicinchoninové kyseliny – 1:50) (Sigma-Aldrich, USA). Následně bylo do jamek polyakrylamidového gelu nanášeno stejné množství proteinů, které činilo 20 μ g. Po elektroforetické separaci byly proteiny přeneseny na PVDF (polyvinyliden fluorid) membránu (Bio-Rad Laboratory, Česká Republika), která byla poté blokována v TBS (Tris-buffered saline) obsahujícím 0.05% Tween 20 a 10% mléka (non-fat dry milk, Bio-Rad). V dalším kroku byla membrána inkubována při 4 °C po dobu 24 hodin s primární protilátkou namířenou proti sledovaným proteinům: p53 (Exbio, Česká Republika), p53_Ser15 (Calbiochem-Merck, Česká Republika), p16^{INK4a}, p21^{WAF1/Cip1}, p38_Thr180/Tyr182, β -aktin, (Sigma-Aldrich, USA), Puma, ERK1/2, ERK_Thr202/Tyr204, JNK, JNK_Thr183/Tyr185 (Cell Signaling Technology, USA). Po inkubaci byly membrány promyty v TBS s 0,05% Tweenem a samotným TBS a

1 hodinu inkubovány s polyklonální anti-myší nebo anti-králičí sekundární protilátkou (DakoCytomation, Česká Republika) v TBS s 0,05% Tweenem 20 a 5% mlékem (non-fat dry milk, Bio-Rad). Komplexy antigenu s protilátkou byly detekovány pomocí chemiluminiscenčního detekčního kitu (Roche, Česká Republika). Výsledný signál byl kvantitativně zachycen na autoradiografický film (Foma, Česká Republika) na vyvolávacím automatu (Fomei, Česká Republika). Pro potvrzení správné nanášky proteinů byla každá membrána reinkubována pro detekci β -aktinu.

4.8 Imunocytochemie

Výskyt γ -H2AX v buňkách byl stanoven pomocí imunofluorescenční mikroskopie. Kontrolní i ovlivněné buňky v počtu 1×10^4 na skupinu byly zpasážovány pomocí 0,05% trypsin-EDTA (Invitrogen, USA), centrifugovány, promyty v PBS a fixovány po 10 minut v 4% paraformaldehydu. Po dalším promytí v PBS byly buňky 30 minut blokovány v roztoku 7% inaktivovaného fetálního bovinního séra s 2% BSA (albumin z bovinního séra) a poté inkubovány s primární myší monoklonální protilátkou proti histonu γ -H2AX (Cell Signaling Technology, USA) po dobu 24 hodin při 4 °C. Následně byly buňky inkubovány s 5,5% oslím sérem v PBS a po 30 minutách na ně byla aplikována sekundární oslí anti-myší FITC konjugovaná protilátka (Jackson Laboratory, USA). Po 1 hodině inkubace ve tmě byla sklička 3x promyta v PBS. Jádro buněk bylo obarveno pomocí fluorescenčního barviva DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol dihydrochlorid) (Sigma, USA). Pro výslednou analýzu obsahu γ -H2AX v buňkách byl použit fluorescenční mikroskop Nikon Elipse (Nikon, Japonsko). K získání kvantitativně srovnatelných výsledků byla expozice a další parametry kamery ve všech kanálech nastaveny na stejné hodnoty pro všechny pozorované preparáty.

4.9 Stanovení aktivity β -galaktosidázy

Pro stanovení aktivity SA- β -galaktosidázy byl použit Senescence β -galactosidase Staining Kit (Cell Signaling Technology, USA) podle instrukcí výrobce. Do komůrky bylo nasazeno 4×10^4 buněk na skupinu. Po odstranění média byly buňky promyty v PBS, zafixovány 10 minut fixačním roztokem a poté opět promyty v PBS. Následně byly buňky přes noc inkubovány v kompletním barvicím roztoku při 37 °C a druhý den byly výsledky analyzovány na mikroskopu Nikon Elipse (Nikon, Japonsko).

4.10 Stanovení apoptózy pomocí TUNEL assay

Ke stanovení počtu apoptotických buněk byl použit detekční kit APO-DIRECT™ (Merck Millipore, USA) podle pokynů výrobce. Přibližně 1×10^6 buněk bylo 2x promyto v PBS o teplotě 4 °C a po dobu 30 minut fixováno na ledu v 1 ml 1% formaldehydu (Polysciences, USA) v PBS. Následně byly buňky centrifugovány, 2x promyty PBS a permeabilizovány nejméně po dobu 24 hodin v 70% etanolu při -20 °C. Po dalším promytí byly buňky 1 hodinu při 37 °C inkubovány ve směsi pro značení buněk pomocí metody TUNEL (dUTP-FITC; TdT enzym, TdT reakční pufr a destilovaná H₂O), po skončení inkubaci byly znovu promyty a resuspendovány do roztoku 0,5 ml propidium jodidu a RNázy. Vzorky byly analyzovány na průtokovém cytometru CyAn™ ADP (Beckman Coulter, USA) za analýzy zelené fluorescence FITC konjugovaného deoxyuridintrifosfátu (dUTP-FITC vázaný k fragmentované DNA apoptotických buněk za katalýzy terminální deoxynukleotidtransferázou) a červené fluorescence obsahu jaderné DNA jednotlivých buněk (propidium jodid vázaný ve stechiometrickém poměru k DNA). Naměřená data byla hodnocena pomocí programu Summit v4.3 (Beckman Coulter, USA).

4.11 Statistická analýza

Pro statistické zpracování dat byl použit program Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Inc., USA). Všechny statisticky hodnocené experimenty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr se standardní směrodatnou odchylkou a byly provedeny třikrát, pokud není uvedeno jinak. Ke zjištění signifikantních rozdílů mezi skupinami byl použit Studentův T-test a za statisticky významný byl považován rozdíl na hladině $P \leq 0,05$.

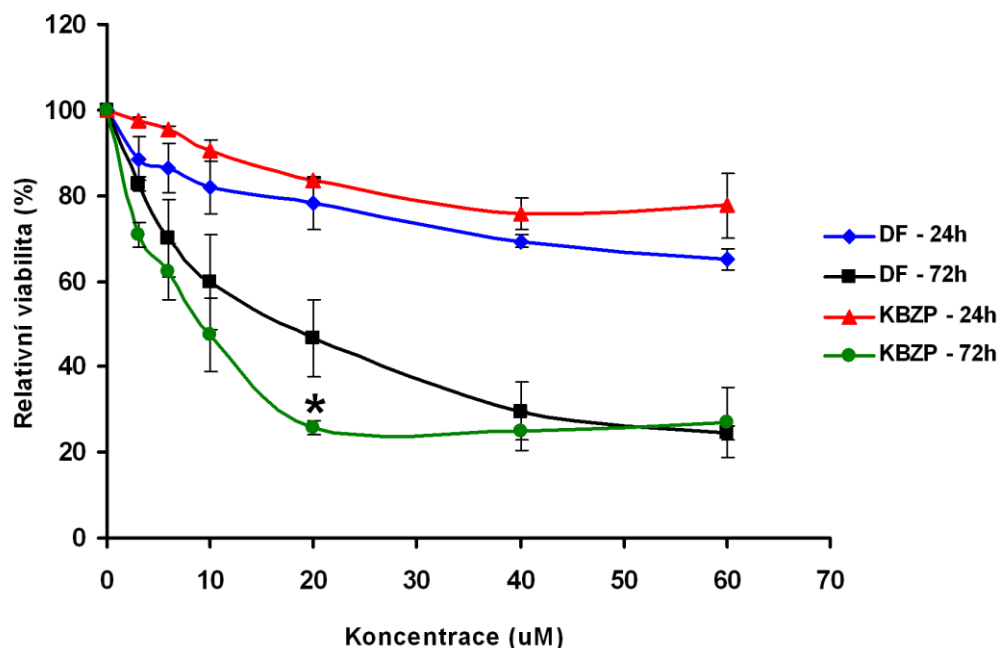
5 VÝSLEDKY

5.1 Vliv cisplatiny na kmenové buňky zubní pulpy a dermální fibroblasty

V první části práce jsme se zabývali reakcí kmenových buněk zubní pulpy (KBZP) a dermálních fibroblastů (DF) na cisplatinou indukované poškození DNA. V této části je popsán vliv cisplatiny (CP) na viabilitu, proliferaci, indukci apoptózy a na změny aktivit klíčových proteinů spojených s procesem buněčné smrti a senescence u obou srovnávaných buněčných typů.

5.1.1 Cytotoxicita cisplatiny

K určení cytotoxicity CP jsme KBZP a DF vystavovali koncentracím v rozmezí od 3 do 60 $\mu\text{mol/l}$ CP a pomocí WST-1 testu jsme vyhodnotili jejich viabilitu za 24 a 72 hodin. U obou buněčných typů docházelo se zvyšující se koncentrací cytostatika ke snižování viability. Po aplikaci 60 $\mu\text{mol/l}$ klesla za 24 hodin viabilita KBZP na 76 %, DF na 65 %. K výraznějšímu prohloubení poklesu viability došlo po 72 hodinách působení, kdy viabilita KBZP klesla na 27 % a DF na 25 % (Obr. 2). K nejvyššímu poklesu životaschopnosti buněk došlo u KBZP již při koncentraci 20 $\mu\text{mol/l}$ CP za 72 hodin, kdy viabilita činila 26 %, zatímco u DF 47 %. KBZP byly signifikantně citlivější ($P \leq 0.05$) k působení 20 $\mu\text{mol/l}$ CP než DF. Dalším zvyšováním koncentrace CP již ke změně viability u KBZP nedocházelo, ke stejnému efektu došlo u DF až po aplikaci 40 $\mu\text{mol/l}$ CP (Obr. 2). Na základě těchto výsledků byly pro další experimenty vybrány koncentrace CP 5 - 40 $\mu\text{mol/l}$.



Obr. 2 Stanovení cytotoxického účinku cisplatiny na kmenové buňky zubní pulpy a dermální fibroblasty

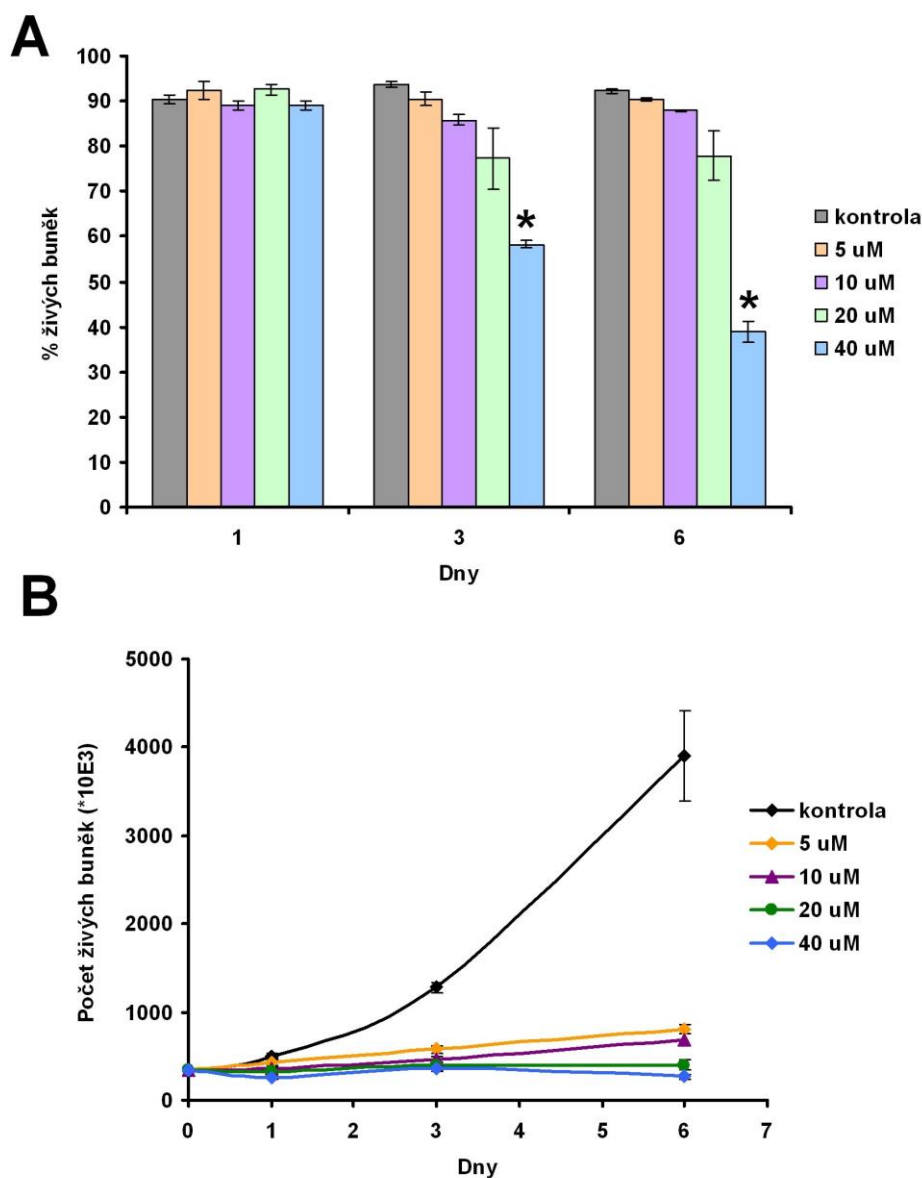
Zastoupení viabilních buněk bylo detekováno pomocí WST-1 testu za 24 a 72 hodin po aplikaci 3 - 60 µmol/l CP. Hodnota naměřeného signálu ovlivněných buněk je vyjádřena v procentech vztažených ke kontrole (100 %). Výsledky jsou znázorněny jako aritmetický průměr ze tří nezávislých měření, ± směrodatná odchylka. Za statisticky významný byl považován rozdíl na hladině $P \leq 0,05$, který byl stanoven pomocí Studentova T-testu. * - statisticky významný rozdíl oproti dermálním fibroblastům ($P \leq 0,05$).

5.1.2 Proliferace a procentuální zastoupení živých buněk

Proliferaci a procentuální zastoupení živých buněk jsme stanovovali za použití barvení trypanovou modří 1., 3. a 6. den po aplikaci 5, 10, 20 a 40 µmol/l CP. U KBZP nedošlo během prvního dne působení CP k nárůstu počtu mrtvých buněk. Signifikantní snížení ($P \leq 0,05$) procent živých buněk bylo pozorováno pouze po 3 a 6 dnech působení 40 µmol/l CP (58 % živých buněk po 3 dnech a 38 % po 6 dnech) (Obr. 3A). Přestože po působení 5, 10 a 20 µmol/l CP se procentuální zastoupení živých buněk signifikantně neměnilo, došlo u KBZP téměř k úplné inhibici proliferace, která přetrvávala po celou dobu experimentu (Obr. 3B).

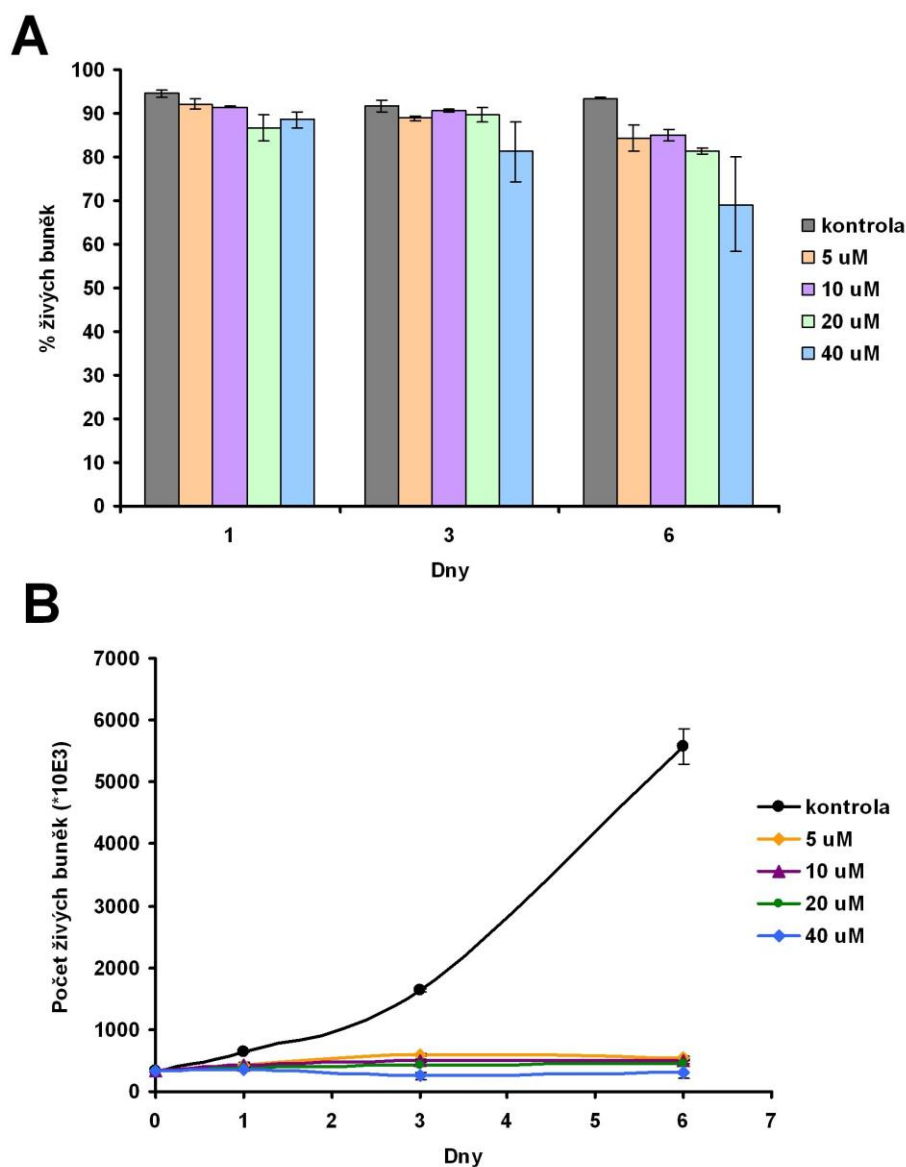
Na rozdíl od KBZP, u DF žádná ze sledovaných koncentrací CP nezpůsobila signifikantní snížení procentuálního zastoupení živých buněk. V kontrolní skupině i v ovlivněných DF se vyskytovalo 85 - 95 % živých buněk. Během pokusu došlo k nesignifikantnímu snížení pouze za 6 dní po aplikaci 40 µmol/l CP, kdy procento

živých DF kleslo na 69 % (Obr. 4A). Stejně jako u KBZP, proliferace DF byla po působení 5, 10, 20 a 40 $\mu\text{mol/l}$ CP po celou dobu experimentu kompletně inhibována (Obr. 4B). Z výsledků je patrné, že KBZP vykazují vyšší senzitivitu k působení CP než DF.



Obr. 3 Procentuální zastoupení živých buněk a proliferace kmenových buněk zubní pulpy po ovlivnění cisplatinou

A) Zastoupení živých KBZP a **B)** proliferace KBZP po ovlivnění 5, 10, 20 a 40 $\mu\text{mol/l}$ CP v intervalu 1, 3 a 6 dní. Zastoupení počtu živých buněk (%) bylo detekováno pomocí přístroje Vi-Cell XR 2.03, proliferace pomocí přístroje Z2 Counter za použití barvení trypanovou modří. Výsledky jsou znázorněny jako aritmetický průměr ze tří nezávislých měření \pm směrodatná odchylka. Za statisticky významný byl považován rozdíl na hladině $P \leq 0,05$, který byl stanoven pomocí Studentova T-testu. * - statisticky významný rozdíl oproti kontrole ($P \leq 0,05$).



Obr. 4 Procentuální zastoupení živých buněk a proliferace dermálních fibroblastů po ovlivnění cisplatinou

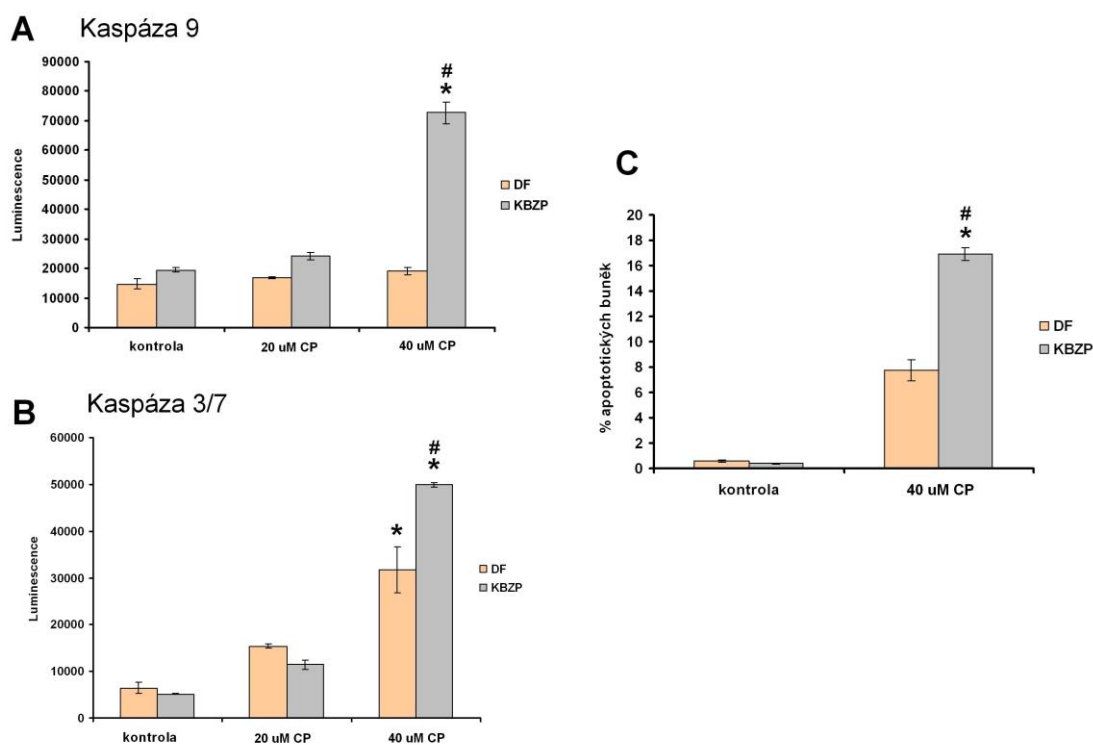
A) Zastoupení živých DF a **B)** proliferace DF po ovlivnění 5, 10, 20 a 40 $\mu\text{mol/l}$ CP v intervalu 1, 3 a 6 dní. Zastoupení počtu živých buněk (%) bylo detekováno pomocí přístroje Vi-Cell XR 2.03, proliferace pomocí přístroje Z2 Counter za použití barvení trypanovou modří. Výsledky jsou znázorněny jako aritmetický průměr ze tří nezávislých měření \pm směrodatná odchylka.

5.1.3 Aktivace kaspáz a indukce apoptózy

Vliv cisplatiny na aktivaci kaspáz 8, 9 a 3/7 jsme studovali 72 hodin po aplikaci 20 a 40 $\mu\text{mol/l}$ CP. Za 24 hodin jsme pozorovali signifikantní vzestup ($P \leq 0.05$) aktivity kaspázy 9 pouze u KBZP ovlivněných 40 $\mu\text{mol/l}$ CP, po nižší koncentraci již

k signifikantní aktivaci kaspázy 9 nedošlo (Obr. 5A). Zvýšení aktivity efektorové kaspázy 3/7 jsme také detekovali pouze za 72 hodin po působení 40 $\mu\text{mol/l}$ CP. Na rozdíl od kaspázy 9 byla kaspáza 3/7 po této koncentraci aktivována u obou buněčných linií, přičemž její vzestup byl u KBZP signifikantně vyšší ($P \leq 0.05$) ve srovnání s DF (Obr. 5B). Změny v aktivaci kaspázy 8 jsme nepozorovali (data nejsou uvedena).

V následujícím experimentu jsme sledovali indukci apoptózy za 72 hodin po aplikaci 40 $\mu\text{mol/l}$ CP pomocí flow-cytometrické analýzy metodou TUNEL. V porovnání s kontrolou jsme pozorovali zvýšení procenta apoptotických buněk. Zatímco v kontrole se vyskytovalo 0,5 % apoptotických buněk, v ovlivněných KBZP se jejich počet signifikantně zvýšil. U DF došlo také k nárůstu apoptotických buněk, ovšem zvýšení nebylo signifikantní. U KBZP bylo 17 % buněk apoptotických, zatímco u DF 8 % (Obr. 5C).

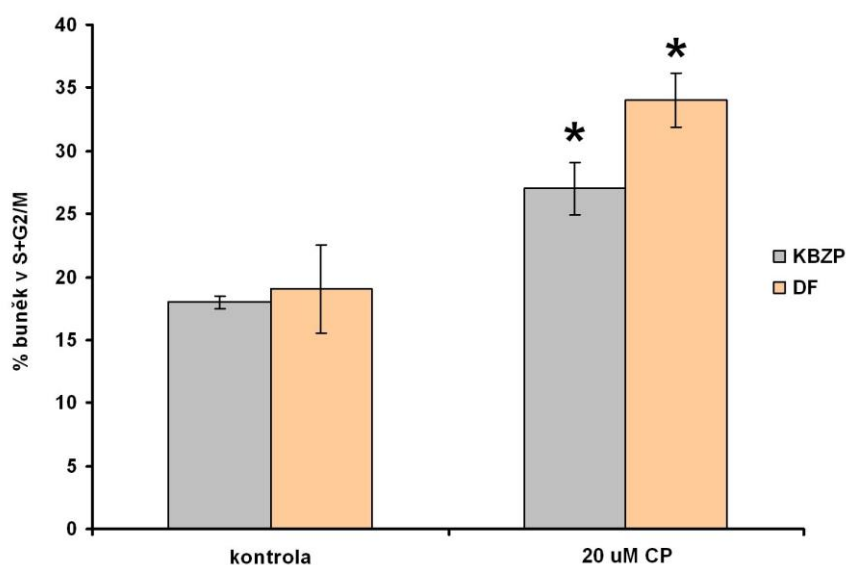


Obr. 5 Vliv cisplatinu na aktivaci kaspáz a indukci apoptózy u kmenových buněk zubní pulpy a dermálních fibroblastů

A) Aktivita kaspázy 9 u KBZP a DF **B)** aktivita kaspázy 3/7 u KBZP a DF za 72 hodin po aplikaci 20 a 40 $\mu\text{mol/l}$ CP. **C)** Flow-cytometrické stanovení apoptotických buněk metodou TUNEL za 72 hodin po ovlivnění 40 $\mu\text{mol/l}$ CP. Hodnoty představují průměr ze tří nezávislých měření, \pm směrodatná odchylka. Za statisticky významný byl považován rozdíl na hladině $P \leq 0,05$, který byl stanoven pomocí Studentova T-testu. * - statisticky významný rozdíl oproti kontrole ($P \leq 0.05$); # - statisticky významný rozdíl oproti DF ($P \leq 0.05$).

5.1.4 Analýza buněčného cyklu

Buněčný cyklus jsme analyzovali pomocí průtokové cytometrie za 72 hodin po ovlivnění buněk 20 $\mu\text{mol/l}$ CP. U obou buněčných linií jsme detekovali zástavu buněčného cyklu v S a G2/M fázi. Za 72 hodin po aplikaci 20 $\mu\text{mol/l}$ CP bylo 34 % KBZP a 27 % DF v S+G2/M fázi (Obr. 6).

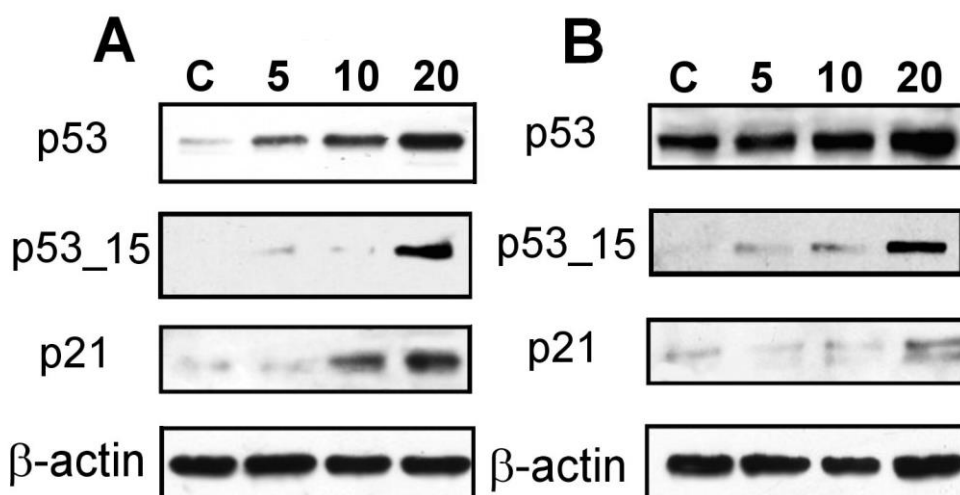


Obr. 6 Flow-cytometrická analýza buněčného cyklu po působení cisplatiny na kmenové buňky zubní pulpy a dermální fibroblasty

Obrázek znázorňuje procentuální zastoupení KBZP a DF v S+G2/M fázi za 72 hodin po ovlivnění 20 $\mu\text{mol/l}$ CP. Výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr ze tří nezávislých měření \pm směrodatná odchylka. Za statisticky významný byl považován rozdíl na hladině $P \leq 0,05$, který byl stanoven pomocí Studentova T-testu. * - statisticky významný rozdíl oproti kontrole ($P \leq 0.05$).

5.1.5 Signální dráha proteinu p53

Změny v expresi proteinu p53, p21^{WAF1/Cip1} a fosforylaci proteinu p53 na serinu 15 jsme stanovovali za 24 hodin po aplikaci 5, 10 a 20 $\mu\text{mol/l}$ CP. V odpovědi na CP vyvolané poškození DNA došlo k výraznému zvýšení množství všech sledovaných proteinů, a to jak u KBZP (Obr. 7A), tak u DF (Obr. 7B). Hladina tumor supresorového proteinu p53 se zvyšovala v závislosti na dávce cytostatika (5, 10 a 20 $\mu\text{mol/l}$) a dosahovala maxima při 20 $\mu\text{mol/l}$ CP. U obou buněčných linií docházelo za 24 hodin ke zvýšené fosforylaci p53 na serinu 15, a to zejména po působení 20 $\mu\text{mol/l}$ CP. Současně se zvyšujícím se množstvím p53 se také zvyšovala hladina inhibitoru cyklin-dependentních kináz proteinu p21^{WAF1/Cip1}.

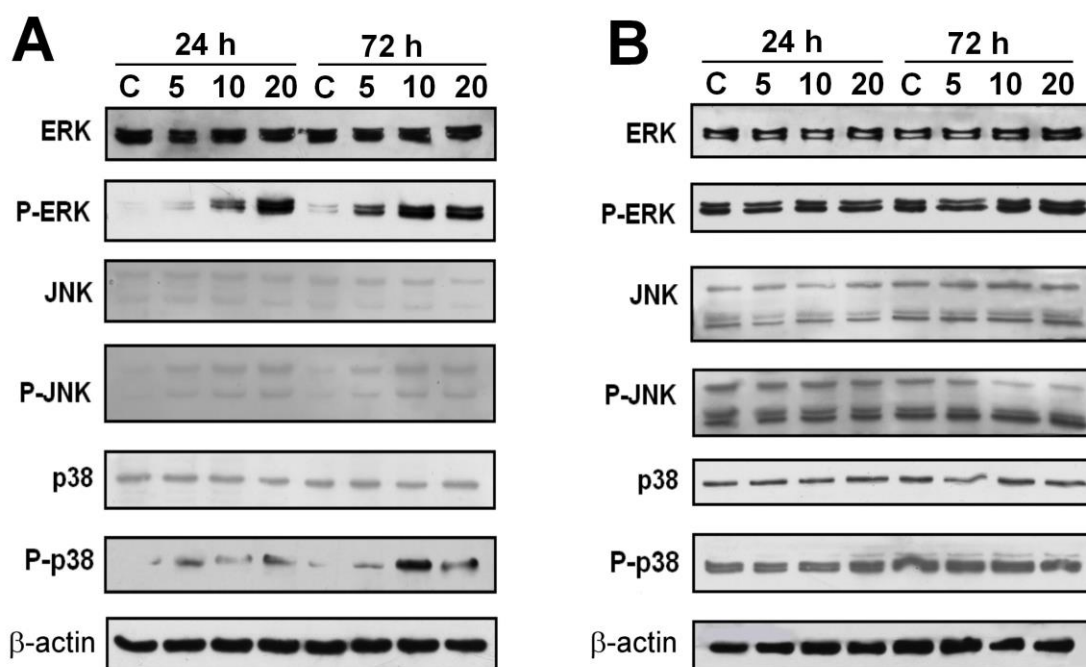


Obr. 7 Aktivace signální dráhy proteinu p53 po působení cisplatiny na kmenové buňky zubní pulpy a dermální fibroblasty

Aktivace proteinu p53, fosforylace p53 na serinu 15 (p53_15) a aktivace p21^{WAF1/Cip1} u **A)** KBZP a **B)** DF ovlivněných po dobu 24 hodin 5, 10 a 20 $\mu\text{mol/l}$ CP. Pro kontrolu nanášky bylo stanoveno množství β -aktinu. Jednotlivé bloty reprezentují výsledky vybrané ze tří nezávislých experimentů; (C=kontrola).

5.1.6 Aktivace mitogeny aktivovaných proteinkináz (MAPK)

Pomocí elektroforézy a Western blottingu jsme stanovili změny v expresi tří hlavních MAPK: extracelulárními signály-regulované kinázy ERK1/2, c-Jun-N-terminální kinázy JNK, kinázy p38 a dále změny v jejich fosforylovaných formách. Zjistili jsme, že CP způsobuje aktivaci všech tří sledovaných MAPK u KBZP (Obr. 8A), ale nikoliv u DF (Obr. 8B). Množství fosforylovaných MAPK u KBZP se zvyšovalo úměrně se zvyšující se dávkou CP, zatímco u DF byla hladina fosforylovaných MAPK stejná ve všech skupinách, jejich množství bylo nezávislé na působení CP. Cisplatina vedla u KBZP k fosforylaci ERK1/2 na threoninu 202 a tyrosinu 204, JNK na threoninu 183 a tyrosinu 185 a k fosforylaci p38 na threoninu 180 a tyrosinu 182. Tyto fosforylace všech tří kináz se s dávkou cytostatika zvyšovaly a dosáhly maxima u nejvyšší sledované koncentrace (20 $\mu\text{mol/l}$). Up-regulaci fosforylovaných kináz u KBZP jsme pozorovali po celou dobu experimentu (za 24 i 72 hodin).



Obr. 8 Aktivace MAPK po působení cisplatiny na kmenové buňky zubní pulpy a dermální fibroblasty

Aktivace ERK1/2, JNK, p38 a jejich fosforylovaných forem u **A)** KBZP a **B)** DF za 24 a 72 hodin po ovlivnění 5, 10 a 20 $\mu\text{mol/l}$ CP. Pro kontrolu správné nanášky jsme stanovili množství β -aktinu. Jednotlivé bloty reprezentují výsledky ze tří nezávislých experimentů; (P-ERK=fosforylovaná kináza ERK1/2 na threoninu 202 a tyrosinu 204; P-JNK=fosforylovaná kináza JNK na threoninu 183 a tyrosinu 185; P-p38=fosforylovaná kináza p38 na threoninu 180 a tyrosinu 182; C=kontrola).

5.1.7 Indukce předčasné senescence

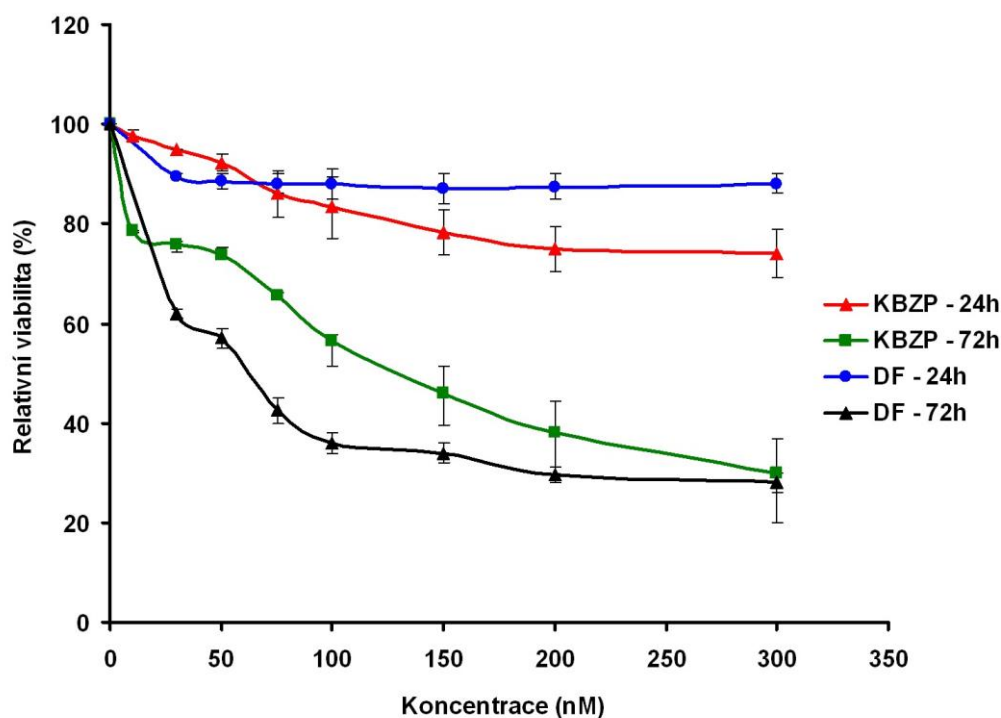
K objasnění procesu SIPS jsme stanovili její dva významné markery - aktivitu β -galaktosidázy a aktivaci inhibitoru cyklin-dependentních kináz, proteinu $\text{p16}^{\text{INK4a}}$. Aktivitu β -galaktosidázy jsme sledovali 3. a 6. den po aplikaci 10 $\mu\text{mol/l}$ CP a změny v aktivaci tohoto enzymu jsme nepozorovali. Dále jsme pomocí elektroforézy a Western blottingu sledovali aktivaci dalšího markeru SIPS – proteinu $\text{p16}^{\text{INK4a}}$. Hladinu $\text{p16}^{\text{INK4a}}$ jsme určovali 1., 3. a 9. den po ovlivnění 5, 10 a 20 $\mu\text{mol/l}$ CP. U obou buněčných linií jsme ovšem v průběhu celého experimentu nedetekovali zvýšení hladiny $\text{p16}^{\text{INK4a}}$.

5.2 Vliv mitoxantronu na kmenové buňky zubní pulpy a dermální fibroblasty

Ve druhé části práce jsme se zabývali vlivem mitoxantronu (MTX) na kmenové buňky zubní pulpy (KBZP) a dermální fibroblasty (DF).

5.2.1 Cytotoxicita mitoxantronu

K určení cytotoxicity MTX jsme KBZP a DF vystavovali koncentracím v rozmezí od 10 do 300 nmol/l MTX a pomocí WST-1 testu jsme zhodnotili jejich viabilitu za 24 a 72 hodin. Viabilita KBZP a DF klesala s rostoucí dávkou MTX. V průběhu 24 hodin nedošlo k výraznému snížení životaschopnosti buněk, viabilita KBZP po dávce 300 nmol/l klesla na 74 %, DF na 86 %. Výrazný pokles viability byl zaznamenán za 72 hodin, kdy po dávce 100 nmol/l MTX viabilita KBZP činila 57 % a DF 36 %. Po aplikaci 300 nmol/l MTX zůstávalo viabilních pouze 30 % KBZP a 28 % DF (Obr. 9). Na základě tohoto testu jsme určili koncentrace pro další studium vlivu MTX na KBZP a DF. V následujících experimentech jsme studovali účinek nižších koncentrací MTX (5, 20 and 50 nmol/l), které neměly tak výrazný vliv na pokles viability, a vyšších (100 a 150 nmol/l MTX), které u obou buněčných typů vedly k výraznému snížení viability.



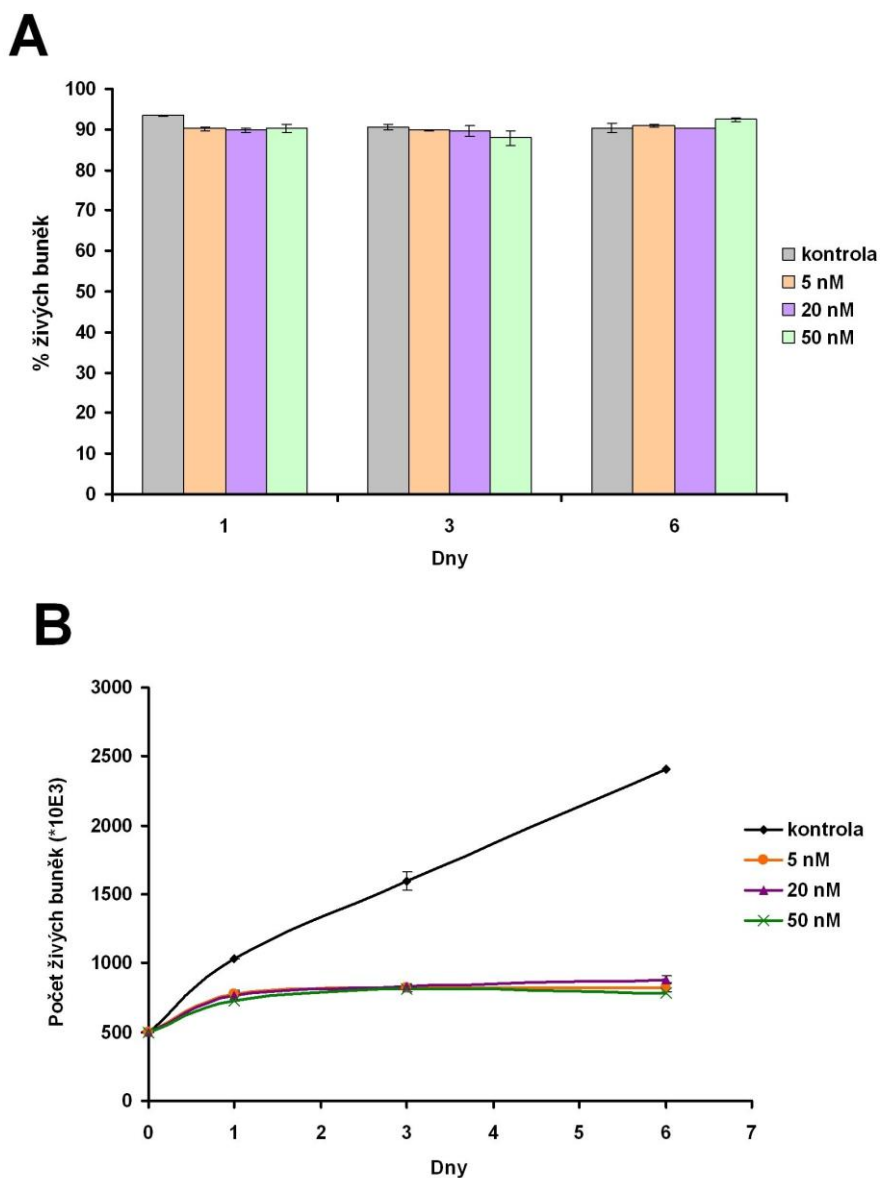
Obr. 9 Stanovení cytotoxického účinku mitoxantronu na kmenové buňky zubní pulpy a dermální fibroblasty

Zastoupení viabilních buněk bylo detekováno pomocí WST-1 testu za 24 a 72 hodin po aplikaci 10 – 300 nmol/l MTX. Hodnota naměřeného signálu ovlivněných buněk je vyjádřena v procentech vztažených ke kontrole (100 %).

5.2.2 Proliferace a procentuální zastoupení živých buněk po nižších koncentracích mitoxantronu

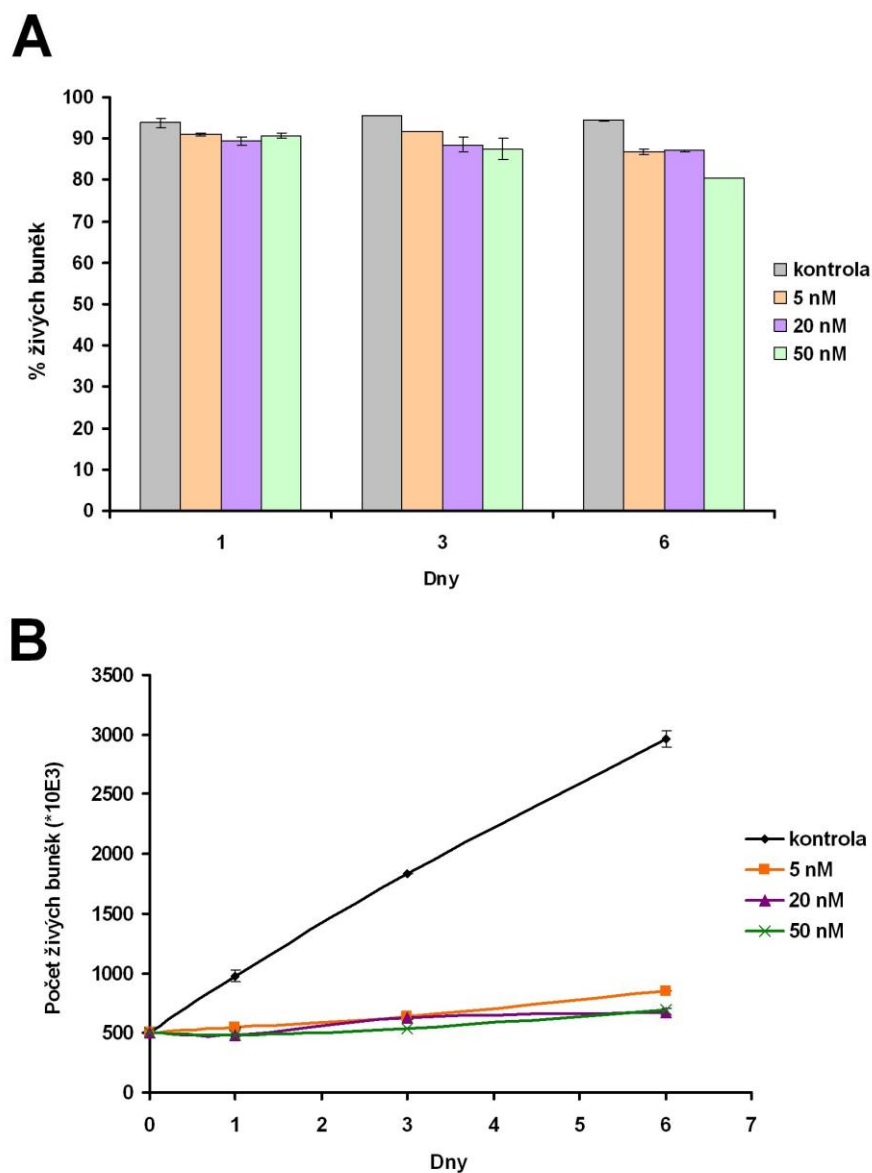
Po stanovení cytotoxicity MTX jsme sledovali proliferaci a procentuální zastoupení živých buněk obou buněčných typů ovlivněných 5, 20 a 50 nmol/l MTX, a to v časech 1, 3 a 6 dní. Zjistili jsme, že procentuální zastoupení živých KBZP (Obr. 10A) i DF (Obr. 11A) se v průběhu celého experimentu podstatně nezměnilo. U KBZP se po ovlivnění MTX pohybovalo v rozmezí od 88 % do 95 %, u DF činilo 87 - 94 %. Mírný pokles jsme zaznamenali pouze u DF za 6 dní po ovlivnění 50 nmol/l MTX, kdy se procento živých buněk snížilo na 80 % (Obr. 11B).

Proliferace KBZP i DF byla po ovlivnění 5, 20 a 50 nmol/l MTX téměř zcela inhibována, počet buněk se v průběhu 6 dní u KBZP (Obr. 10B) ani DF (Obr. 11B) výrazně neměnil.



Obr. 10 Procentuální zastoupení živých buněk a proliferace kmenových buněk zubní pulpy po ovlivnění mitoxantronem

A) Zastoupení živých KBZP a **B)** proliferace KBZP po ovlivnění 5, 20 a 50 nmol/l MTX v intervalu 1, 3 a 6 dní. Zastoupení počtu živých buněk (%) bylo provedeno pomocí přístroje Vi-Cell XR 2.03, proliferace pomocí přístroje Z2 Counter za použití barvení trypanovou modří. Výsledky jsou znázorněny jako aritmetický průměr ze tří nezávislých měření \pm směrodatná odchylka.

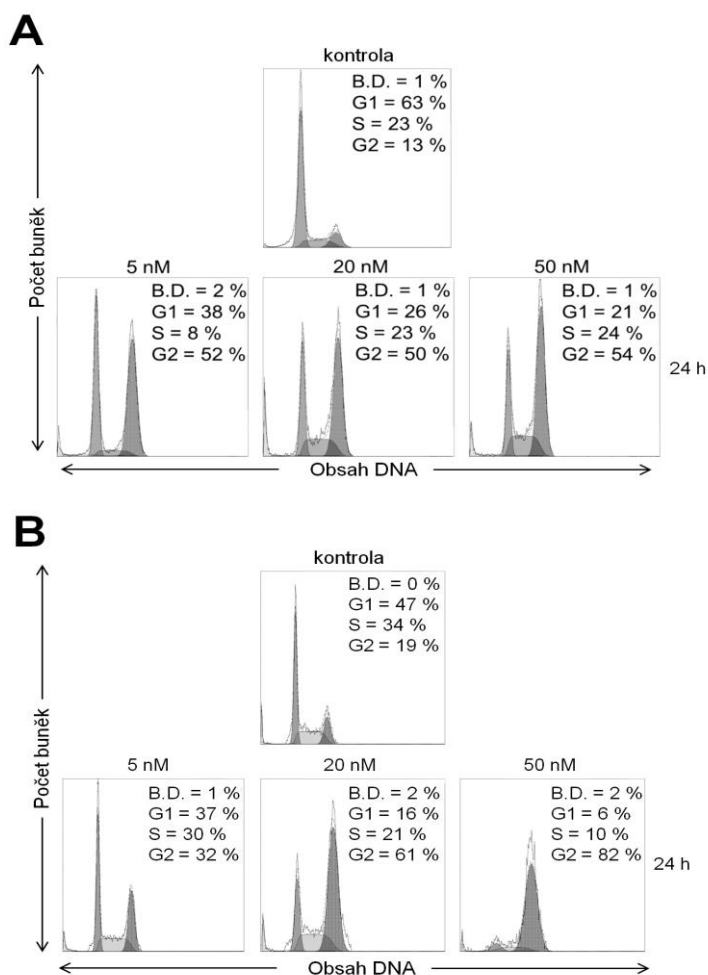


Obr. 11 Procentuální zastoupení živých buněk a proliferace dermálních fibroblastů po ovlivnění mitoxantronem

A) Zastoupení živých DF a **B)** proliferace DF po ovlivnění 5, 20 a 50 nmol/l MTX v intervalu 1, 3 a 6 dní. Zastoupení počtu živých buněk (%) bylo provedeno pomocí přístroje Vi-Cell XR 2.03, proliferace pomocí přístroje Z2 Counter za použití barvení trypanovou modří. Výsledky jsou znázorněny jako aritmetický průměr ze tří nezávislých měření \pm směrodatná odchylka.

5.2.3 Indukce předčasné senescence po nižších koncentracích MTX

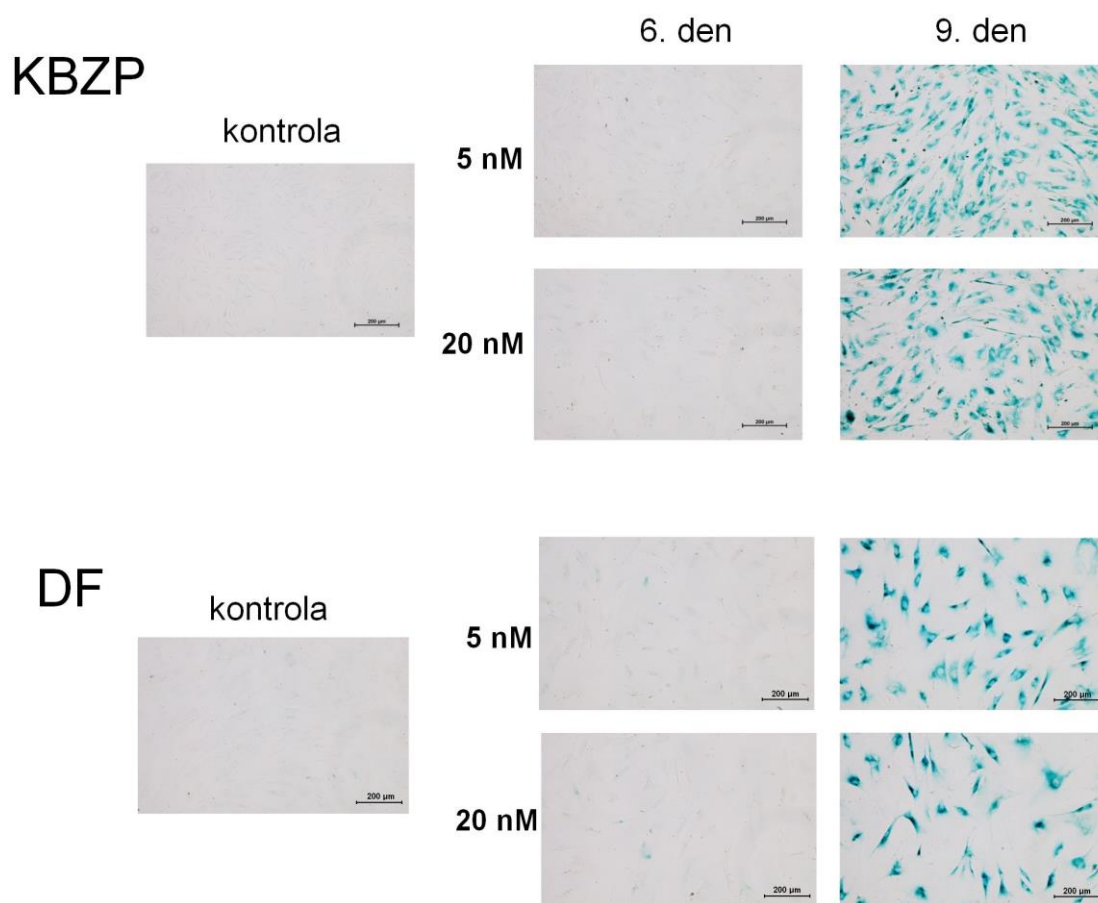
Výsledky testů proliferace ukázaly, že nízké dávky MTX (<50 nmol/l) vedou k inhibici růstu KBZP a DF, aniž by došlo k nárůstu počtu mrtvých buněk. V dalším kroku jsme se zabývali otázkou, v jaké fázi cyklu jsou buňky zastaveny. Buněčný cyklus jsme analyzovali za 1 den po aplikaci 5, 20 a 50 nmol/l MTX. U obou buněčných typů jsme pozorovali zástavu buněčného cyklu v G2 fázi. Zatímco v kontrole bylo v G2 fázi přítomno 13 % KBZP a 22 % DF, po ovlivnění KBZP bylo přibližně 50 % buněk zastaveno v G2 fázi (5 nmol/l - 52 %; 20 nmol/l - 50 %; 50 nmol/l - 54 %) (Obr. 12A). U DF došlo po ovlivnění 5 nmol/l MTX ke zvýšení počtu buněk v G2 bloku na 37 %, po 20 nmol/l na 56 % a po 50 nmol/l stoupl počet buněk v G2 fázi na 86 % (Obr. 12B).



Obr. 12 Analýza buněčného cyklu po působení mitoxantronu na kmenové buňky zubní pulpy a dermální fibroblasty

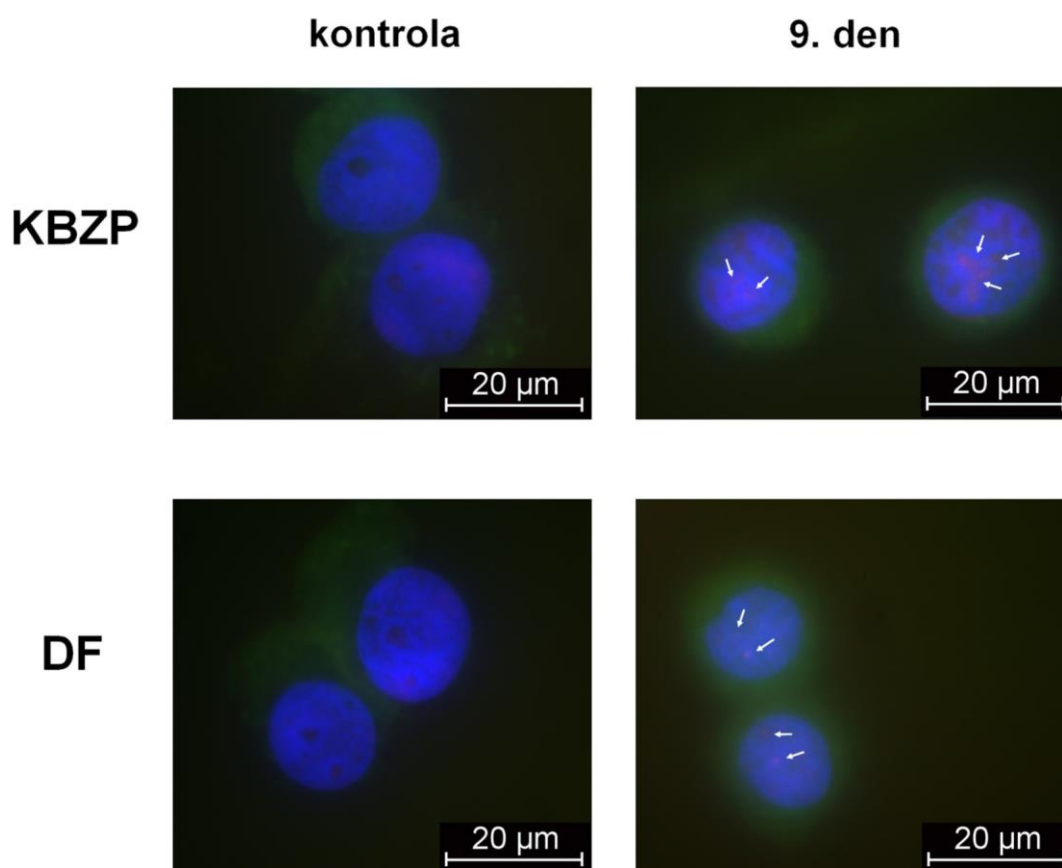
Pomocí flow-cytometrického stanovení obsahu DNA byla stanovena distribuce buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu 1. den po aplikaci 5, 20 a 50 nmol/l MTX u **A) KBZP** a **B) DF**; (B.D.=background debris).

V další fázi práce jsme studovali, zda-li u KBZP a DF dochází k indukci stresem-indukované předčasné senescence (SIPS). K objasnění procesu SIPS jsme stanovili její dva významné markery - aktivitu β -galaktosidázy a přetrvávající ložiska fosforylovaného histonu H2AX (γ -H2AX). Aktivitu β -galaktosidázy jsme sledovali 6. a 9. den po aplikaci 5 a 20 nmol/l MTX. Šestý den od ovlivnění buněk ještě ke změnám v aktivitě tohoto enzymu nedošlo, ovšem 9. den již byla aktivita β -galaktosidázy u obou buněčných linií zvýšena (Obr. 13). Také jeden z dalších markerů senescence, ložiska γ -H2AX, přetrvávala 9 dní po ovlivnění 5 nmol/l MTX, a to u obou buněčných typů (Obr. 14).



Obr. 13 Stanovení aktivity β -galaktosidázy po působení mitoxantronu na kmenové buňky zubní pulpy a dermální fibroblasty

A) Aktivita β -galaktosidázy u KBZP a **B)** DF 6. a 9. den po ovlivnění 5 a 20 nmol/l MTX. Aktivita enzymu byla detekována histochemicky.



Obr. 14 Fosforylace histonu H2AX po působení mitoxantronu na kmenové buňky zubní pulpy a dermální fibroblasty

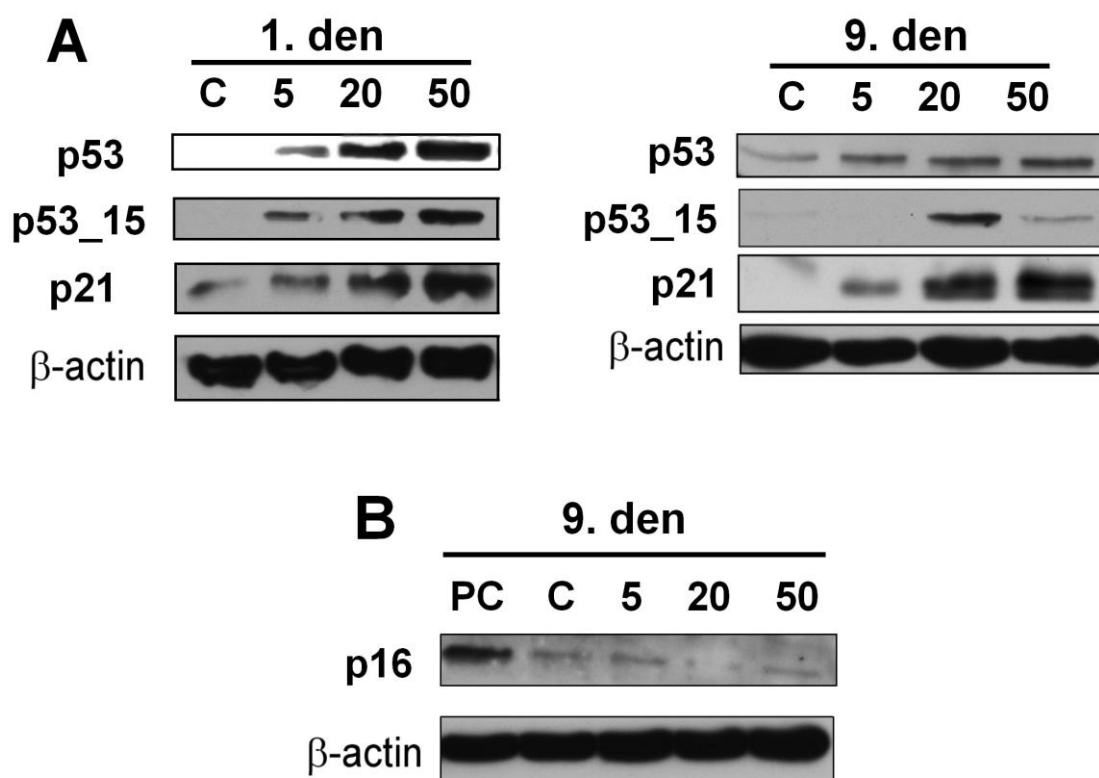
Přetrvávající ložiska γ -H2AX 9 dní po aplikaci 5 nmol/l MTX. Stanovení bylo provedeno pomocí imunofluorescenční mikroskopie.

5.2.4 Aktivace signálních drah po působení MTX

U obou buněčných typů jsme pomocí elektroforézy a Western blottingu sledovali změny v expresi proteinů po působení nižších koncentrací MTX (<50 nmol/l). Nejprve jsme se zaměřili na signální dráhu proteinu p53. Analýzu proteinů jsme provedli 1. a 9. den po působení 5, 20 a 50 nmol/l MTX. První den po aplikaci MTX došlo ke zvýšení hladiny p53, jeho fosforylované formy na serinu 15 (p53₁₅) a inhibitoru cyklin-dependentních kináz, proteinu p21^{WAF1/Cip1}, a tato aktivace přetrvávala po celou dobu experimentu (9 dní). Nárůst celkového množství byl dávkově závislý, se zvyšující se koncentrací MTX docházelo k vzrůstu množství těchto proteinů, a to jak u KBZP (Obr. 15), tak u DF (Obr. 16).

Následně jsme se zaměřili na aktivaci dalšího inhibitoru cyklin-dependentních kináz - proteinu p16^{INK4a}, kterému je připisována role jednoho z hlavních regulátorů SIPS. Zatímco proteiny p53, p53₁₅ a p21^{WAF1/Cip1} byly po působení MTX aktivovány

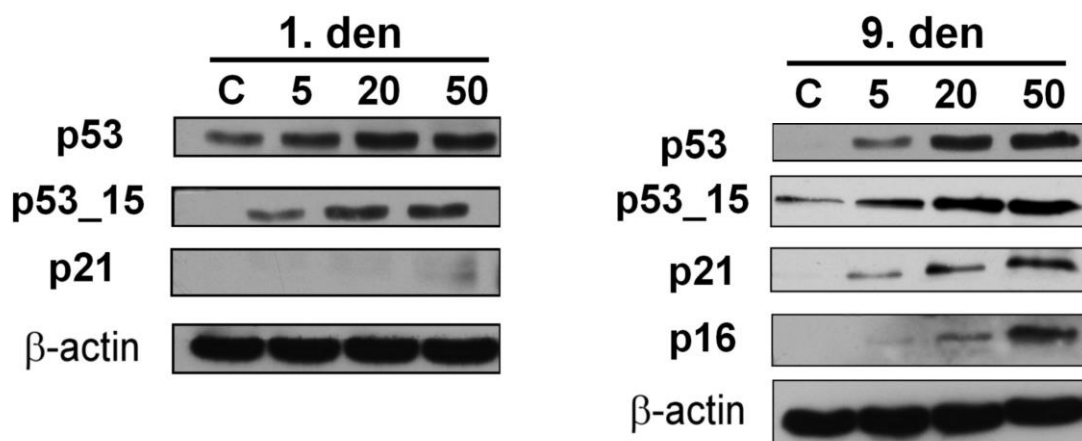
u KBZP i DF, k aktivaci proteinu $p16^{\text{INK4a}}$ došlo pouze u DF. Hladinu $p16^{\text{INK4a}}$ jsme sledovali 1., 3., 6. a 9. den po ovlivnění 5, 20 a 50 nmol/l MTX. Zatímco 1., 3., 6. den nebyl protein $p16^{\text{INK4a}}$ aktivován (data nejsou uvedena), po 9 dnech došlo u DF k jeho dávkově závislému vzestupu (Obr. 16). U KBZP jsme aktivaci proteinu $p16^{\text{INK4a}}$ nepozorovali ani 9. den po ovlivnění MTX (Obr. 15B).



Obr. 15 Aktivace vybraných proteinů u kmenových buněk zubní pulpy po ovlivnění mitoxantronem

A) Aktivace proteinu p53, fosforylace p53 na serinu 15 (p53_15) a aktivace proteinu p21^{WAF1/Cip1} u KBZP 1. a 9. den po ovlivnění 5, 20 a 50 nmol/l MTX.

B) Hladina proteinu $p16^{\text{INK4a}}$ 9 dní po aplikaci MTX. Pozitivní kontrolu (PC) představují DF ovlivněné 50 nmol/l MTX. Pro kontrolu nanášky bylo stanoveno množství β -aktinu. Jednotlivé bloty reprezentují výsledky vybrané ze tří nezávislých experimentů; (C=kontrola).

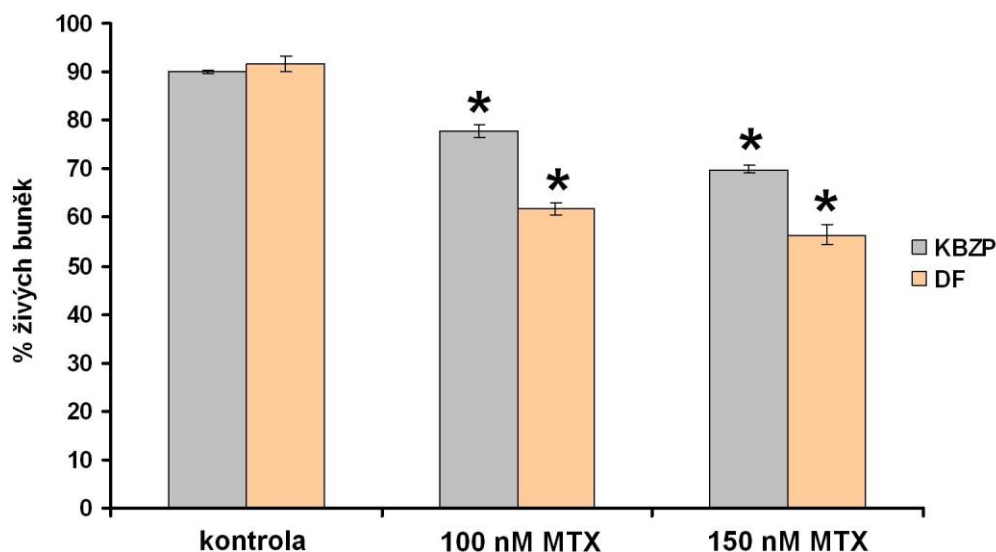


Obr. 16 Aktivace vybraných proteinů u dermálních fibroblastů po ovlivnění mitoxantronem

Aktivace proteinu p53, fosforylace p53 na serinu 15 (p53_15), aktivace p21^{WAF1/Cip1} a p16^{INK4a} 1. a 9. den po ovlivnění 5, 20 a 50 nmol/l MTX. Pro kontrolu nanášky bylo stanoveno množství β-aktinu. Jednotlivé bloty reprezentují výsledky ze tří nezávislých experimentů; (C=kontrola).

5.2.5 Navození apoptózy po působení vyšších koncentrací MTX

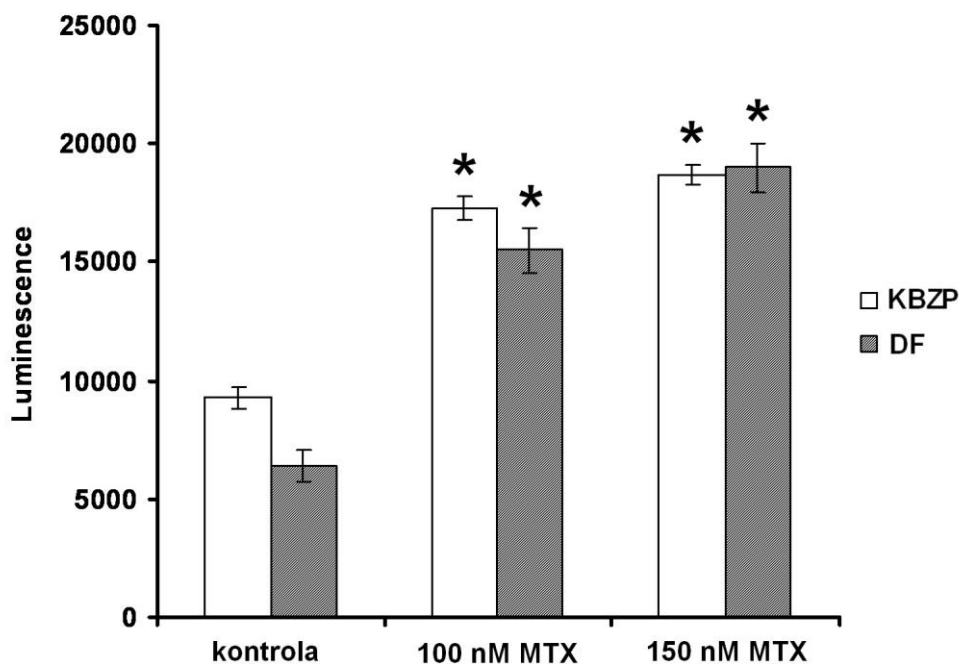
Po objasnění vlivu nižších koncentrací MTX na KBZP a DF, jsme se v další části práce zabývali vlivem vyšších koncentrací MTX (>50 nmol/l). Jak ukázalo stanovení cytotoxicity, tyto koncentrace vedly ke snížení viability KBZP i DF. K dalšímu objasnění tohoto účinku jsme buňky vystavovali koncentracím 100 a 150 nmol/l MTX a 3. den jsme pomocí barvení trypanovou modří určili zastoupení živých a mrtvých buněk. U obou buněčných typů jsme po ovlivnění MTX pozorovali signifikantní snížení počtu živých buněk. Procentuální zastoupení živých KBZP kleslo po aplikaci 100 nmol/l MTX na 78 %, po 150 nmol/l MTX na 70 % ve srovnání s kontrolou (90 %). Podobný trend byl zaznamenán i u DF, po ovlivnění 100 nmol/l MTX bylo zastoupeno 62 % živých buněk ve srovnání s kontrolou (91 %), po aplikaci 150 nmol/l MTX 50 % (Obr. 17).



Obr. 17 Procentuální zastoupení živých kmenových buněk zubní pulpy a dermálních fibroblastů po ovlivnění mitoxantronem (>50 nmol/l)

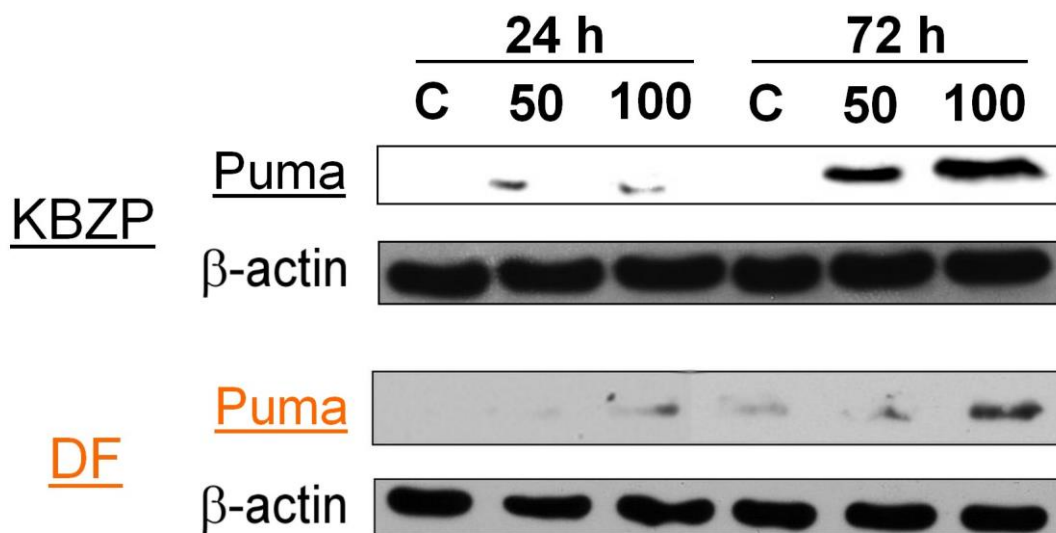
Procentuální zastoupení živých KBZP a DF za 3 dny po aplikaci 100 a 150 nmol/l MTX. Stanovení bylo provedeno pomocí přístroje Vi-Cell XR 2.03 za použití barvení trypanovou modří. Hodnoty představují průměr ze tří nezávislých měření, \pm směrodatná odchylka. Za statisticky významný byl považován rozdíl na hladině $P \leq 0,05$, který byl stanoven pomocí Studentova T-testu. * - statisticky významný rozdíl oproti kontrole ($P \leq 0.05$).

Protože MTX ve vyšších koncentracích (100 a 150 nmol/l) způsoboval procentuální snížení živých buněk, zaměřili jsme se na indukci aktivace efektorové kaspázy 3/7. Tři dny po ovlivnění 100 a 150 nmol/l MTX jsme pozorovali signifikantní nárůst aktivity kaspázy 3/7 ve srovnání s kontrolou. Zvýšení aktivity kaspázy 3/7 bylo dávkově závislé (Obr. 18). Dále jsme v odpovědi na MTX vyvolané poškození DNA zaznamenali výrazné zvýšení pro-apoptického členu rodiny Bcl-2 proteinů, proteinu Puma (p53 upregulated modulator of apoptosis). Pomocí elektroforézy a Western blottingu jsme detekovali jeho nárůst zejména 3. den po ovlivnění 100 a 150 nmol/l MTX, a to u obou buněčných typů (Obr. 19).



Obr. 18 Aktivace kaspázy 3/7 u kmenových buněk zubní pulpy a dermálních fibroblastů po ovlivnění mitoxantronem

Aktivita kaspázy 3/7 u KBZP a DF 3 dny po aplikaci 100 a 150 nmol/l MTX. Hodnoty představují průměr ze tří nezávislých měření, \pm směrodatná odchylka. Za statisticky významný byl považován rozdíl na hladině $P \leq 0,05$, který byl stanoven pomocí Studentova T-testu. * - statisticky významný rozdíl oproti kontrole ($P \leq 0,05$).



Obr. 19 Aktivace pro-apoptického proteinu Puma u kmenových buněk zubní pulpy a dermálních fibroblastů po ovlivnění mitoxantronem

Hladina proteinu Puma u KBZP a DF 1. a 3. den po ovlivnění 50 a 100 nmol/l MTX. Pro kontrolu nanášky bylo stanoveno množství β-aktinu. Jednotlivé bloty reprezentují výsledky vybrané ze dvou nezávislých experimentů; (C=kontrola).

6 DISKUZE

Cytostatická terapie představuje jeden z nejvyužívanějších přístupů k potlačení růstu nádorových buněk u maligních onemocnění. V závislosti na buněčném typu a rozsahu poškození DNA může docházet vlivem cytostatické terapie nejen k indukci apoptózy, ale také k nekróze, mitotické katastrofě, přechodné zástavě buněčného cyklu nebo k tzv. stresem-indukované předčasné senescenci (SIPS) (Karagiannis a El-Osta 2004). Je zřejmé, že při terapii jsou cytostatikům vystavovány nejen buňky nádorové, ale také buňky normální. Většina buněk s poškozeným genomem je odstraňována apoptotickým procesem, kdy dojde k jejich rozpadu a následné fagocytóze. Zatímco apoptózou jsou buňky odstraněny definitivně, buňky, které reagovaly na poškození DNA indukcí SIPS, setrvávají v organismu trvale. SIPS představuje důležitou přirozenou bariéru bránící tumorigenezi, ovšem za určitých podmínek mohou senescentní buňky naopak tumorigenezi podporovat, a to zejména sekrecí matrix metaloproteináz, růstových faktorů a cytokinů (Dimri 2005, Campishi a d'Adda di Fagana 2007). Přesto, že je SIPS považována za ochranný mechanismus před nekontrolovatelným dělením poškozených buněk, nezodpovězenou otázkou zůstává, zda-li u normálních buněk, které podlely SIPS, nemůže za určitých okolností dojít k jejich reaktivaci a následnému dělení s poškozeným genomem a vzniku tumoru (Kahlem et al. 2004).

Mezenchymální kmenové buňky (MKB) jsou součástí většiny tkání organismu, kde zodpovídají za udržení tkáňové homeostázy a v současné době se stávají významným zdrojem terapeuticky využitelných kmenových buněk. Jednou z dobře dostupných tkání pro odběr MKB představuje zubní pulpa. Z ní izolované kmenové buňky vykazují všechny charakteristické vlastnosti KB, k nimž patří schopnost sebeobnovy, široký proliferační a diferenciační potenciál (Graziano et al. 2008). Díky relativně snadné dostupnosti představují kmenové buňky zubní pulpy velice slibný nástroj pro buněčnou terapii, ovšem pro jejich bezpečné využití je nutné důkladné poznání jejich vlastností.

Jak reagují normální buňky na poškození DNA různými stimuly? Většina studií na normálních buňkách byla provedena na fibroblastech, které představují snadno dostupný zdroj mezenchymálních buněk pro výzkum molekulárních mechanismů. Trvalou zástavu buněčného cyklu indukuje u fibroblastů celá řada faktorů poškozujících DNA různým mechanismem: například peroxid vodíku (Chen et al. 1995, Frippiat et al.

2001), ultrafialové záření (Debacq-Chainiaux et al. 2005), tert-butylhydroperoxid (t-BHP), ethanol (Dumont et al. 2000), busulfan (Probin et al. 2007), síran měďnatý či stimulace některými cytokiny (Acosta et al. 2008). Bylo však prokázáno, že lidské fibroblasty nereagují na genotoxický stres pouze vstupem do SIPS, ale za určitých podmínek u nich může dojít k indukci apoptózy. V naší studii CP ve vyšších dávkách indukovala u DF apoptózu (Seifrtová et al. 2012). Nedávné studie na lidských embryonálních plicních fibroblastech WI-38 ozářených γ zářením (Ćmielová et al. 2011) a lidských kožních fibroblastech vystavených působení pyridia zinku (bis(2-pyridylthio)zinc 1,1'-dioxidu) (Rudolf a Červinka 2011) také ukázaly, že část buněk po aplikaci těchto nox podlehlá apoptóze, zatímco u zbývajících buněk došlo k indukci SIPS.

V naší práci jsme studovali vliv dvou vybraných cytostatik, cisplatiny (CP) a mitoxantronu (MTX), na kmenové buňky zubní pulpy (KBZP). Reakci KBZP jsme porovnávali s reakcí lidských dermálních fibroblastů (DF).

V první části práce jsme se zabývali odpovědí KBZP a DF na terapii cisplatinou. Je známo, že fyziologická koncentrace CP v plazmě se po skončení infuze pohybuje v rozmezí od 2 do 8,4 $\mu\text{mol/l}$ (Goodisman a Souid 2006). Studie ukázaly, že hladina CP v plazmě je detekovatelná i roky po chemoterapii. Předpokládá se, že dlouhodobě přetrvávající zvýšená hladina CP je důsledkem postupného uvolňování CP do krve z regenerujících se tkání. Bylo prokázáno, že takto uvolňovaná CP může být stále reaktivní a schopná vazby na proteiny (Brouwers et al. 2008). Vzhledem k odlišné senzitivitě buněk k působení CP byly v různých *in vitro* studiích testovány řady odlišných koncentrací CP. Jak reagují buňky na různé koncentrace CP? Obecně byly většinou testovány koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$ a vyšší, které v mnoha studiích vedly k indukci apoptózy (Berndtsson et al. 2007), a to zejména u nádorových buněk (Jones et al. 1998, Pestell et al. 2000, Konstatakou et al. 2009).

Jakým způsobem reagují nádorové buňky na působení CP? Kuwahara et al. 2000 se zabývali mechanismy cisplatinou-indukované apoptózy na lidských nádorových liniích izolovaných z karcinomu hlavy a krku (HNSCC – head and neck squamous cell carcinoma) z hlediska aktivace kaspáz. U HNSCC docházelo k aktivaci kaspázy 8, 9 i 3, ale hlavní roli v indukci apoptózy hrála iniciátorová kaspáza 9 zapojená do vnitřní mitochondriální cesty. Tento fakt potvrdily i jiné studie, Mueller et al. 2003 zkoumali indukci apoptózy na k CP senzitivních (H12.1) a resistantních (1411HP) nádorových testikulárních buňkách a zjistili, že po aplikaci nižších dávek CP (3 a 10 $\mu\text{mol/l}$) dochází

u senzitivní linie H12.1 k apoptóze prostřednictvím kaspázy 9, nikoliv kaspázy 8. Inhibicí kaspázy 9 dále prokázali vyšší resistenci buněčné linie H12.1 k CP. Nicméně u resistantní linie 1411HP, kdy docházelo k indukci apoptotického procesu až při vyšších koncentracích CP, byla apoptóza zprostředkovaná na kaspáze 9 nezávislou cestou. Mueller et al. 2003 se ve své práci soustředili na indukci exprese Bcl-2 proteinů a proteinu p53. Zatímco u obou buněčných linií docházelo po expozici CP ke zvýšení hladiny proteinu p53, změny v hladině proteinů z rodiny Bcl (Bcl-2, Bcl XL, Bax, Bak) nebyly pozorovány. Na druhou stranu, u leukemické linie Jurkat docházelo ke změnám v hladinách proteinů z rodiny Bcl-2, a apoptóza byla prokazatelně navozena vnitřní mitochondriální cestou (Wang et al. 2006). Stejně tak u nádorových buněk močového měchýře T24 docházelo k navození apoptózy vnitřní mitochondriální cestou a rodina proteinů Bcl-2 byla do regulace buněčné smrti zapojena (Cho et al. 2006). Naše výsledky korelují s většinou studií provedených na nádorových buňkách. Námi testované mezenchymální buňky reagovaly na aplikaci vyšší dávky CP (40 $\mu\text{mol/l}$) indukci apoptotického procesu, přičemž KBZP vykazovaly vyšší senzitivitu k působení CP než DF. Po aplikaci 40 $\mu\text{mol/l}$ CP došlo u obou testovaných buněčných typů ke snížení viability buněk a zvýšení aktivity kaspáz 9 a 3/7, nikoliv kaspázy 8. Podobně jako v naší práci, ve většině studií nebylo zapojení vnější signální apoptotické dráhy přes aktivaci kaspázy 8 pozorováno. Je zřejmé, že KBZP a DF reagují na působení vyšších koncentrací CP spuštěním apoptotického procesu vnitřní mitochondriální cestou, nikoliv vnější, která je zprostředkována zejména kaspázou 8.

Reakce KBZP i DF na CP byla dále doprovázená zvýšenou hladinou proteinu p53, jeho fosforylací na serinu 15 a aktivací proteinu p21^{WAF1/Cip1}. Je známo, že protein p53 hraje v indukci apoptózy po poškození DNA cisplatinou velmi důležitou roli a mutace v genu pro protein p53 je důležitým faktorem zapříčiňujícím ztrátu apoptotických funkcí. Nicméně téměř u 50 % nádorů je tento protein mutován, a přestože dochází ke ztrátě funkce p53, některé buněčné linie zůstávají k CP senzitivní a indukují apoptózu na p53 nezávislou cestou. Ve většině studií převládá fakt, že citlivost buněk k CP souvisí s přítomností wild typu p53, a že v případě nefunkčního proteinu p53 dochází ke zvýšené resistenci buněk k tomuto cytostatiku (Fan et al. 1995, Pestell et al. 2000). Nicméně některé práce ukazují, že zrušení funkce p53 činí nádorové buňky k CP více senzitivní než resistantní, jak by se předpokládalo, což dokazuje například studie na prsních nádorových buňkách MCF-7 (Fan et al. 1995). Zvýšenou senzitivitu k CP lze například přisoudit proteinu p21^{WAF1/Cip1}, který po inaktivaci p53 nepřispívá

k zástavě buněčného cyklu a výsledkem pak může být předčasný vstup do mitózy. Například studie Zamble et al. 1998 na myších testikulárních nádorových buňkách ukazují, že inhibice proliferace je stejnou měrou způsobena dvěma možnými mechanismy, p53 závislou i p53 nezávislou cestou a wild typ proteinu p53 není zcela zodpovědný za cytotoxicitu CP. Obecně můžeme říci, že role proteinu p53 v indukci apoptotického procesu po expozici buněk CP zůstává kontroverzní, apoptóza může být navozena jak na p53 závislou, tak na p53 nezávislou cestou (Todd a Lippard 2009). V naší práci KBZP a DF reagovaly na expozici nižších dávek CP zvýšením hladiny p53 a cesta proteinu p53 byla do regulace buněčného osudu zapojena.

Je třeba zmínit, že některé publikované studie se zabývají otázkou indukce apoptózy CP, která je nezávislá na přímém poškození DNA. Indukce apoptózy byla pozorována jako důsledek tvorby aduktů s proteiny vyskytující se mimo jádro a jako následek tvorby kyslíkových radikálů. Bylo zjištěno, že CP vytváří adukty nejen s DNA, ale také s proteiny; 25 $\mu\text{mol/l}$ CP indukuje v buňce 5×10^4 DNA aduktů a více jak 10^6 proteinových aduktů (Faivre et al. 2003). Problematicke takto pozměněných proteinů v důsledku působení CP se věnovali Berndtsson et al. 2007 a zjistili, že takto velké množství proteinových aduktů může vést ke spuštění apoptotického procesu nezávisle na poškození DNA. Ve své studii testovali lidské střevní nádorové buňky HCT116 a buňky melanomu 224. Po aplikaci vyšších dávek CP (20, 30, 40 $\mu\text{mol/l}$) docházelo k tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS - reactive oxygen species) a ke spuštění apoptotického procesu doprovázeného zvýšenou aktivitou kaspázy 3. Stejný trend byl u těchto buněk pozorován i po odstranění jádra. Taktéž Mandic et al. 2003 ve své studii u buněk 224 a HCT116 prokázali, že i po odstranění jádra dochází po aplikaci 20 $\mu\text{mol/l}$ CP k aktivaci kaspáz a k indukci apoptotického procesu. Vzhledem k námi pozorované aktivaci jaderných proteinů je tento mechanismus u KBZP a DF vysoce nepravděpodobný.

Doposud jsme diskutovali indukci apoptózy vyvolanou působením cisplatiny na nádorové buněčné linie, ovšem námi studované KBZP a DF patří mezi buňky normální, nenádorové. Co je známo o vlivu CP na normální buňky? Jelikož hlavním limitujícím faktorem pro klinické použití CP je její nefrotoxicita, některé studie se věnují reakci normálních renálních buněk. Například Jiang et al. 2009 prokázali indukci apoptózy na myších renálních p53 negativních buňkách. Po aplikaci CP docházelo ke zvýšení hladiny pro-apoptotických proteinů Bax a Bak, k uvolnění cytochromu c z mitochondrií

a k aktivaci kaspáz. Stejně tak studie Pabla et al. 2008 prokazuje indukci apoptotického procesu po aplikaci CP (20 $\mu\text{mol/l}$) na renálních tubulárních buňkách.

Zatímco reakce nádorových buněk na genotoxický stres vyvolaný CP byly intenzivně studovány, studií na normálních buňkách mezenchymálního původu nebylo provedeno mnoho a reakce námi studovaných mezenchymálních kmenových buněk představují doposud neprobádané pole. Některé studie se věnují reakci mezenchymálních kmenových buněk (MKB) izolovaných z kostní dřeně. Například Mueller et al. 2006 ve své studii porovnávali indukci apoptózy CP mezi MKB kostní dřeně a senzitivními testikulárními zárodečnými nádorovými buňkami (TGCT), které vykazovaly stejné vlastnosti jako embryonální nádorové buňky. MKB vykazovaly vyšší rezistenci k CP než TGCT a k indukci apoptózy byla potřebná vyšší dávka než u linie TGCT. Jednou z hypotéz je, že stupeň odolnosti buněk ke genotoxickému stresu souvisí s důležitostí jednotlivých buněčných typů pro vznik nových progenitorů (Mueller et al. 2006).

V další studii MKB izolované z kostní dřeně vykazovaly vyšší rezistenci k CP ve srovnání s reakcí lymfocytů izolovaných z periferní krve a leukemickou linií K562 (Prendergast et al. 2011). Obecně můžeme konstatovat, že kmenové buňky ve srovnání například s leukemickými liniemi vykazují vyšší rezistenci vůči cytostatikům, ovšem senzitivita silně závisí na druhu použitého cytostatika (Li et al. 2004). Také v naší práci byla k indukci apoptotického procesu u KBZP a DF potřebná vyšší dávka cytostatika ve srovnání s ostatními studiemi provedenými na nádorových buňkách.

Apoptóza nepředstavuje jedinou odpověď na terapii CP, po aplikaci CP dochází u některých buněčných linií také k indukci SIPS. V naší práci aplikace klinicky relevantní koncentrace 5 $\mu\text{mol/l}$ CP vedla *in vitro* u obou buněčných typů k inhibici proliferace. Také po expozici buněk 10 a 20 $\mu\text{mol/l}$ CP došlo k potlačení buněčného růstu, aniž by byla indukována buněčná smrt apoptózou. Mezi první studie poukazující na senescentní fenotyp buněk po působení CP patří studie Wang et al. 1998, ve které po aplikaci CP prokázali zvýšenou aktivitu β -galaktosidázy a zástavu buněčného cyklu v G2/M a S fázi u nazofaryngálních nádorových buněk. Přesto, že u KBZP a DF došlo k zastavení buněčného dělení, v průběhu našeho experimentu jsme nedetekovali zvýšenou aktivitu β -galaktosidázy. Stejně tak nebyla nedetekována zvýšená hladina proteinu p16^{INK4a} podílejícího se na trvalé zástavě buněčného cyklu. Naproti tomu Fang et al. 2007 ve své práci na plicních nádorových buňkách NSCLC ukazují, že protein

p16^{INK4a} se po působení CP aktivuje a je zodpovědný za indukci SIPS. Po aplikaci nižších dávek CP (5 $\mu\text{mol/l}$) pozorovali u klonu buněk NSCLC s vloženým genem pro p16^{INK4a} zvýšenou aktivitu β -galaktosidázy a zástavu buněčného cyklu v G2/M fázi (za 3 dny po aplikaci CP). Také Berndtsson et al. 2007 se své práci zabývali odpovědí buněk izolovaných z karcinomu tlustého střeva HCT116 a buněk melanomu 224 na nižší koncentrace CP. Po vystavení buněk 5 $\mu\text{mol/l}$ CP prokázali inhibici proliferace, zvýšenou aktivitu β -galaktosidázy (5 dní po ovlivnění). Dále pozorovali 6 dní po aplikaci 10 $\mu\text{mol/l}$ CP zástavu buněčného cyklu a aktivaci proteinu p53 (za 20 h po ovlivnění). Tato studie koreluje s našimi výsledky, kdy po nižších dávkách CP došlo u obou buněčných typů k inhibici proliferace a zástavě buněčného cyklu. V další studii se McKenna et al. 2012 věnovali účinku mitomycinu C, působícího podobným mechanismem jako námi studovaná CP (alkylační agens), na nádorové buňky malobuněčného karcinomu plic A549. Prokázali jak indukci apoptózy, tak permanentní zástavu buněčného cyklu. Po aplikaci nižších dávek mitomycinu C došlo k navození SIPS, zatímco vyšší koncentrace této látky vyvolala apoptózu (McKenna et al. 2012). V naší práci jsme analýzou obsahu DNA v buňkách detekovali akumulaci buněk v S a G2/M fázi (po ovlivnění 20 $\mu\text{mol/l}$ CP), a to ve stejné míře u obou testovaných buněčných typů. Bylo zjištěno, že většina buněčných linií skutečně reaguje na poškození DNA cisplatinou zástavou buněčného cyklu v G2 fázi (Sorensen a Eastman 1988, Siddik 2003), ačkoliv u některých studií byla pozorována i zástava v G1 fázi. Například v práci Zhao et al. 2004 CP u lidských plicních fibroblastů indukovala zástavu v G1 fázi, která byla doprovázena zvýšením hladiny proteinu p53 a indukcí SIPS. Zástava buněčného cyklu v S a G2/M fázi, kterou jsme v naší práci pozorovali po nižší dávce CP, poukazuje na spuštění obranného mechanismu buněk vůči poškození DNA cisplatinou. Zda-li je tato zástava trvalá, nebylo v našem experimentu prokázáno.

Hlavní odlišnost v reakci KBZP a DF po ovlivnění CP jsme pozorovali v aktivaci mitogeny-aktivovaných proteinkináz (MAPK). Zatímco u KBZP docházelo k aktivaci všech tří hlavních MAPK – ERK1/2, JNK i p38, reakce DF byla na aktivaci MAPK nezávislá. U KBZP došlo k dávkově závislé fosforylaci těchto kináz, zatímco u DF nikoliv.

Obecně je přijímán fakt, že aktivace dráhy ERK1/2 vede k podpoře proliferace a k mitogenní stimulaci. Bylo zjištěno, že k aktivaci ERK1/2 dráhy dochází po působení CP také u některých nádorových buněčných typů, k nimž patří například buňky

ovariálního karcinomu, HeLa buňky, buňky neuroblastomu nebo osteosarkomu (Woessman 2002). Cisplatinou indukovaná aktivace ERK1/2 může být také zapojena do aktivace a fosforylace proteinu p53 (Milne et al. 1994), stejně tak je tato dráha spojována s reparačními procesy a buněčným přežíváním (Zhang a Liu 2002). Bylo zjištěno, že aktivace ERK1/2 pomocí specifického aktivátoru PAM (phorbol 12-myristate 13-acetate) vede k vyšší senzitivě buněk ovariálního karcinomu k CP. Ve srovnání s odpovědí nádorových buněk ovaria k samotné CP, došlo po aplikaci CP v kombinaci s PAM k výraznému snížení růstu buněk, fosforylaci ERK1/2, aktivaci kaspázy 9 a zvýšenému počtu apoptotických buněk (Nonaka et al. 2012). Je známo, že poškození DNA cisplatinou vyvolá i aktivaci řady reparačních proteinů. Li a Melton 2012 ve své práci zjistili, že exprese reparačního proteinu ERCC1 je u melanomových buněk regulována ERK1/2 signální dráhou. Inhibice této dráhy zabránila zvýšené expresi reparačního proteinu a došlo tak k zvýšené senzitivě buněk k CP.

V odpovědi na poškození DNA cisplatinou je často aktivována také JNK dráha a ve většině případů má tato aktivace pro-apoptický efekt. Pro-apoptická role JNK po působení CP byla prokázána například u nádorových buněk žaludku, NIH 3T3 fibroblastů nebo u buněk ovariálního karcinomu (Vasilevskaya a O'Dwyer 2003). Apoptóza závislá na aktivaci JNK byla po aplikaci CP prokázána také například u buněk ovariálního karcinomu (Zhang et al. 2012). Stejně jako u JNK kinázy, je výsledný efekt aktivace další kinázy, proteinu p38, po ovlivnění CP pro-apoptický. Cisplatinou indukovaná aktivace p38 byla prokázána u NIH 3T3 fibroblastů (Sanchez-Prieto 2000), buněk karcinomu děložního čípku a ovariálního karcinomu (Brozovic a Osmak 2007). Na druhou stranu například ve studii Persons et al. 1999 nebyla u ovariálních nádorových buněk tato aktivace pozorována, zatímco k aktivaci JNK a ERK1/2 u těchto buněk docházelo. Studie Wang et al. 2000 ukázala, že po expozici nádorových cervikálních buněk HeLa k CP dochází k aktivaci všech tří hlavních MAPK cest. V jejich práci měla hlavní vliv na proces apoptózy zejména aktivace ERK1/2 dráhy. Také v další studii na této linii Yeh et al. 2002 potvrzuje důležitou roli ERK1/2 cesty na buněčné přežívání, kdy při inhibici ERK1/2 dráhy došlo k resistenci těchto buněk k CP. Na druhou stranu v práci Bae et al. 2006 ukazují, že do regulace buněčné smrti byla zapojena u buněk SNU-16 (nádorové buňky žaludku), U937 (leukemická linie) a 293T (fibroblasty izolované z ledvin) kináza JNK, zatímco k aktivaci ERK1/2 nedošlo po působení CP u žádné z těchto testovaných linií.

Obecně souběžná aktivace všech tří hlavních MAPK drah (v závislosti na buněčném typu a působícím agens) přispívá k antagonistickým odpovědím – v případě aktivace ERK1/2 k přežívání, v případě aktivace SAPK k apoptóze. U KBZP došlo k aktivaci všech tří MAPK, snížení viability a aktivaci kaspáz 9 a 3/7, zatímco u DF k aktivaci MAPK nedošlo a tyto buňky vykazovaly vyšší rezistenci k působení CP. KBZP byly k působení CP citlivější než DF a je možné, že tento jev souvisí právě s aktivací SAPK, které se na aktivaci buněčné smrti podílejí.

V další části práce jsme se zabývali odpovědí KBZP a DF na působení mitoxantronu (MTX). Jak již bylo osvětleno, MTX řadíme mezi inhibitory topoisomerázy II, které indukují dvojité zlomy DNA (DSBs), které představují jedno z nejzávažnějších poškození DNA. V plazmě se MTX rychle váže na proteiny a proniká do krevních elementů. MTX je také velkou měrou distribuován do tkání a následné uvolnění z tkání do krve je pomalé. Vylučování je třífázové, maximální plazmatický poločas se pohybuje v rozmezí 23 až 215 hodin (Van Belle et al. 1986). Plazmatická koncentrace je proměnlivá, většinou se pohybuje okolo 2 – 10 nmol/l (Richards et al. 1992). V naší studii jsme pracovali s koncentracemi MTX, které řádově odpovídají plazmatické koncentraci tohoto cytostatika při terapii.

Jak reagují různé buněčné typy na námi studované cytostatikum? Většina hematopoetických buněčných linií reaguje na mitoxantronem vyvolané poškození DNA spuštěním apoptotického procesu. MTX vyvolává apoptózu například u lidských leukemických linií MOLT-4 a Jurkat, kdy za 24 hodin po aplikaci 5 nmol/l MTX podlehálo buněčné smrti více jak 50 % ovlivněných buněk (Seifrtová et al. 2011). Stejně tak byla indukce apoptózy pozorována u B lymfocytů při chronické lymfatické leukémii (Bellosillo et al. 1998), dále pak u lidských myeloidních leukemických buněk HL-60, kdy aplikace MTX (0,01 - 10 μ mol/l) vedla k fragmentaci jaderné DNA a apoptóze již za 1 hodinu po působení cytostatika (Bhalla et al. 1993). K obdobným výsledkům dospěli i Ray et al. 1994, kteří u buněčné linie HL-60 v časných intervalech (4 h) pozorovali fragmentaci DNA po dávce 0,25 μ mol/l, také Boland et al. 2000 prokázali indukci apoptotického procesu doprovázenou aktivací kaspázy 3 na senzitivní buněčné linii HL-60.

K indukci programované buněčné smrti dochází zejména u buněk hematopoetických, ovšem tato odpověď byla pozorována také u některých buněk izolovaných ze solidních tumorů. Indukce apoptózy po působení MTX (0,6 μ mol/l)

doprovázená zvýšením aktivity kaspázy 3 byla zjištěna například u buněk izolovaných z myšího prsního adenokarcinomu MTLn3 (Kluza et al. 2004), dále pak u nádorových prostatických buněk LNCaP a DU145 (za 72 hodin po aplikaci 50 nmol/l MTX) (Flaig et al. 2007). U myších embryonálních fibroblastů NIH 3T3 vedla aplikace vyšších dávek MTX (1 μ mol/l) ke spuštění apoptotického procesu (Koceva-Chyla et al. 2005).

Zatímco u hematopoetických linií dochází ve většině případů po DSBs k indukci programované buněčné smrti, u buněk mezenchymálního původu dochází v reakci na tento druh poškození DNA také k indukci SIPS. Některé buněčné typy reagují na DSBs pouze indukcí apoptózy nebo navozením SIPS, zatímco u některých linií byla pozorována aktivace obou cest, a to zejména v závislosti na dávce aplikovaného genotoxického agens.

V naší práci KBZP i DF reagovaly na vyšší dávky MTX (>50 nmol/l) indukcí apoptózy, kdy po aplikaci MTX došlo k dávkově závislému snížení viability, zvýšení aktivity kaspázy 3/7 i hladiny pro-apoptotického proteinu z rodiny Bcl-2 Puma. Po aplikaci nižších dávek (<50 nmol/l) došlo u obou typů k indukci SIPS. Porovnejme naši práci s výsledky studií vlivu jiných inhibitorů topoisomeráz (doxorubicin, etoposid, camptothecin), které působí stejným mechanismem účinku jako námi testovaný MTX. V souladu s naší studií, u buněčné linie HCT116 izolované z karcinomu tlustého střeva docházelo po aplikaci nižších dávek camptothecinu (inhibitor topoisomerázy I) k indukci SIPS, zatímco vyšší dávky vedly k indukci programované buněčné smrti (Han et al. 2002). Tyto výsledky také korelují s reakcí KBZP i DF na léčbu cisplatinou (Seifrtová et al. 2012). V další studii (Rudolf et al. 2012) porovnávali vliv irinotecanu na normální střevní epiteliální buňky (NCM) a na normální střevní fibroblasty (NCF). U obou buněčných typů byla po aplikaci irinotecanu pozorována apoptóza i SIPS, ovšem s rozdílnou dominancí. NCM podléhaly více buněčné smrti, zatímco u NCF převládala indukce SIPS.

U některých buněčných typů ovlivněných inhibitory topoisomeráz došlo k indukci SIPS bez známek navození apoptotického procesu. Trvalá zástava buněčného cyklu byla pozorována například u nádorových buněk střevního karcinomu HCT-116 a prsního karcinomu MCF-7 po léčbě doxorubicinem (Gewirtz et al. 2008). Podobně etoposid, další z inhibitorů topoizomerázy II, indukoval SIPS u střevních LS174T a HCT116, prsních MCF-7, a u A2780 ovariálních nádorových buněk (te Poele et al. 2002).

Jak reagují mezenchymální kmenové buňky na DSBs vyvolané ionizujícím zářením? Mezenchymální kmenové buňky izolované z kostní dřeně neumírají po ozáření apoptózou, a to ani po vysokých dávkách, ale pouze ztrácejí schopnost proliferovat. Po poškození DNA ionizujícím zářením byla pozorována SIPS u MKB izolovaných z kostní dřeně (Chen et al. 2006, Serakinci et al. 2007, Schönmeier et al. 2008), z periodontálního ligamenta (Ćmielová et al. 2012) a ze zubní pulpy (Muthná et al. 2010).

V rámci studie jsme se také zabývali expresí jednotlivých proteinů aktivujících se po poškození DNA. Po aplikaci MTX došlo ke zvýšení hladiny proteinu p53 a jeho fosforylované formy na serinu 15. Stejně tak došlo u obou buněčných typů k aktivaci inhibitoru cyklin-dependentních kináz p21^{WAF1/Cip1}. Rozdíl v proteinové expresi mezi KBZP a DF jsme pozorovali v aktivaci dalšího inhibitoru cyklin-dependentních kináz, proteinu p16^{INK4a}. Zatímco u fibroblastů došlo po ovlivnění buněk MTX ke zvýšení hladiny p16^{INK4a}, u KBZP nebyl tento protein v průběhu celého experimentu aktivován.

Jak bylo vysvětleno v úvodu, v závislosti na závažnosti poškození DNA může aktivace cesty p53-p21^{WAF1/Cip1} i proteinu p16^{INK4a} vyvolat u některých buněčných typů SIPS. Obě tyto cesty spolupracují na procesu SIPS a zdá se, že zatímco aktivace dráhy p53-p21^{WAF1/Cip1} zapříčiňuje dočasnou zástavu buněčného cyklu, aktivace p16^{INK4a} zajišťuje zástavu permanentní (Itahana et al. 2001). V práci jsme detekovali zvýšení hladiny p16^{INK4a} prvně devátý den po aplikaci MTX, a to pouze u DF. Tento výsledek koreluje s výsledkem Robles a Adami 1998, kteří detekovali zvýšenou expresi p16^{INK4a} po vystavení dermálních fibroblastů bleomycinu (induktor DSBs), a současně prokázali SIPS 8 dní po aplikaci tohoto agens. U KBZP nedošlo v průběhu celého experimentu (1., 3., 6. a 9. den po aplikaci MTX) k aktivaci p16^{INK4a}. Reakce KBZP na působení MTX je odlišná od odpovědi KBZP na ozáření γ zářením. U KBZP došlo po ozáření dávkou 20 Gy k indukci SIPS se všemi jejími charakteristickými znaky. Ke zvýšení aktivity β -galaktosidázy a ke zvýšení hladiny p16^{INK4a} došlo u KBZP 3., 6. i 13. den od ozáření. Zatímco hladina proteinu p16^{INK4a} stoupala v závislosti na čase, hladina proteinu p21^{WAF1/Cip1} byla nejvyšší 1. den po ozáření a postupně docházelo k jejímu snižování. Zástava buněčného cyklu v G2 fázi byla pozorována od 1. dne a přetrvávala po celou dobu experimentu (13 dní) (Muthná et al. 2010).

Stejně tak u ozářených hematopoetických kmenových buněk dochází k navození SIPS prostřednictvím aktivace jak cesty p53-p21^{WAF1/Cip1}, tak p16^{INK4a} (Wang et al. 2006). Obecně můžeme konstatovat, že ve většině studií je indukce SIPS spjata

s aktivací p16^{INK4a}. I přes tento fakt, v některých studiích se poukazuje na skutečnost, že SIPS nemusí být nutně doprovázená up-regulací p16^{INK4a} (Mirzayans et al. 2012). Například v práci Chang et al. 1999 byla u nádorových buněk fibrosarkomu ozářených γ zářením pozorována SIPS, aniž by tyto buňky exprimovaly p16^{INK4a}. Dále bylo zjištěno, že aktivovaný protein p53 může také přispívat ke snížené expresi p16^{INK4a} (Huschtscha et al. 2009). V naší práci je u KBZP i 9. den po aplikaci MTX hladina proteinu p53 stále zvýšena, což může mít vliv na potlačení exprese p16^{INK4a}. K potvrzení této hypotézy jsou nutné další rozsáhlé studie.

V souvislosti s navozením SIPS jsme u KBZP a DF detekovali aktivitu β -galaktosidázy. U obou buněčných typů došlo ke zvýšení aktivity β -galaktosidázy, a to prvně 9 dní po aplikaci MTX. Detekce aktivity β -galaktosidázy byla doposud provedena u MKB vystavených ionizujícímu záření. Zatímco Schönmeier et al. 2008 popisují nárůst aktivity β -galaktosidázy u krysích MKB izolovaných z kostní dřeně po 3 a 7 dnech po ozáření dávkami 7 a 12 Gy, Chen et al. 2006 u lidských MKB z kostní dřeně nárůst β -galaktosidázy nepozorovali (po 5 dnech po záření dávkou 9 Gy). Naproti tomu aktivace β -galaktosidázy byla prokázána u KBZP (Muthná et al. 2010), u KB izolovaných z periodontálního ligamenta a MKB z kostní dřeně ozářených dávkou 20 Gy (Čmielová et al. 2012). Jedním z dalších markerů SIPS po poškození DNA dvojitými zlomy jsou ložiska fosfoproteinu γ -H2AX, indikující přetrvávající poškození DNA (Nakamura et al. 2008). Po aplikaci nižších dávek MTX jsme v průběhu 9 dní detekovali přetrvávající ložiska γ -H2AX jak u KBZP, tak u DF. Stejně tak Zhao et al. 2008 detekovali tato ložiska u MTX ovlivněných buněk izolovaných z plicního adenokarcinomu. Dále jsme zjistili, že u KBZP i DF dochází po aplikaci konvenčních dávek MTX (<50 nmol/l) k zástavě buněčného cyklu v G2 fázi. Tento fakt koreluje s výsledkem práce Zhao et al. 2008, kteří také po aplikaci MTX detekovali zástavu buněčného cyklu v G2 a S fázi u buněk izolovaných z plicního adenokarcinomu. Stejně tak ozáření lidských embryonálních kmenových buněk (Filion et al. 2009), KBZP (Muthná et al. 2010), MKB z kostní dřeně a KB z periodontálního ligamenta (Čmielová et al. 2012) vedlo k zastavení těchto buněk v G2 fázi. V některých dalších studiích byla v reakci na DSBs prokázána zástava buněčného cyklu jak v G1, tak G2 fázi, například u fibroblastů po působení bleomycinu (Robles and Adami 1998) nebo po jejich ozáření γ zářením (Di Leonardo et al. 1994).

7 ZÁVĚR

Naše práce objasňuje reakci lidských mezenchymálních kmenových buněk izolovaných ze zubní pulpy na dvě vybraná cytostatika – cisplatinu a mitoxantron. Současně porovnává tuto odpověď s odpovědí lidských dermálních fibroblastů.

Shrneme-li získané poznatky, kmenové buňky zubní pulpy i fibroblasty reagují na léčbu cisplatinou dvojím mechanismem. Po aplikaci vyšších dávek cisplatiny dochází u obou buněčných typů ke snížení viability a následné indukci apoptotického procesu doprovázeného zvýšením aktivity kaspáz, přičemž kmenové buňky zubní pulpy vykazují zvýšenou senzitivitu k cisplatině ve srovnání s fibroblasty. Na nižší dávky cisplatiny reagují kmenové buňky zubní pulpy i fibroblasty zástavou proliferace bez známek snížení viability a zástavou buněčného cyklu v S a G2/M fázi. U obou buněčných typů dochází k aktivaci cesty proteinu p53. K významnému rozdílu mezi těmito buněčnými typy dochází v aktivaci proteinů z rodiny mitogeny aktivovaných proteinkináz. Zatímco u kmenových buněk zubní pulpy jsou po působení cisplatiny aktivovány všechny tři hlavní cesty – p38, JNK, ERK1/2, u fibroblastů je aktivace těchto cest na cisplatině nezávislá.

Také v reakci na mitoxantron dochází u obou buněčných typů k aktivaci dvou odlišných mechanismů, které oba přispívají k udržení tkáňové homeostázy. Po aplikaci vyšších dávek mitoxantronu dochází ke snížení viability a k navození apoptotického procesu, který je doprovázen zvýšením aktivity kaspáz a aktivací pro-apoptotického proteinu z rodiny Bcl-2 - Puma. Po vystavení buněk nižším, terapeuticky relevantním koncentracím mitoxantronu, dochází k inhibici růstu buněk a k navození stresem-indukované předčasné senescence. U obou buněčných typů dochází k aktivaci cesty proteinu p53, ke zvýšení aktivity β -galaktosidázy a zástavě buněčného cyklu v G2 fázi. Ložiska γ -H2AX v místě poškození DNA dvojitými zlomy přetrvávají v buňkách i v pozdních intervalech po ovlivnění. Reakce kmenových buněk zubní pulpy a fibroblastů se v rámci naší práce liší pouze v expresi jednoho z inhibitorů cyklin-dependentních kináz, proteinu p16^{INK4a}. Zatímco u fibroblastů dochází k aktivaci tohoto proteinu, u kmenových buněk zubní pulpy jsme tuto aktivaci nepozorovali.

Námi zjištěné cesty aktivované v reakci na cytostatickou terapii – apoptóza, zástava buněčného cyklu i stresem indukovaná předčasná senescence, brání proliferaci cytostatiky zasažených buněk a přispívají tak k ochraně organismu před možným dělením buněk s poškozeným genomem.

8 LITERATURA

ACOSTA, J.C., O'LOGHLEN, A., BANITO, A., GUIJARRO, M.V., AUGERT, A., RAGUZ, S., FUMAGALLI, M., DA COSTA, M., BROWN, C., POPOV, N., TAKATSU, Y., MELAMED, J., D'ADDA DI FAGAGNA, F., BERNARD, D., HERNANDO, E., GIL, J. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell*, 2008, vol. 133, no. 6, s. 1006-18.

AGARWAL, M.L., TAYLOR, W.R., CHERNOV, M.V., CHERNOVA, O.B., STARK, G.R. The p53 network. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, vol. 273, no. 1, s. 1-4.

ALARCON-VARGAS, D., RONAI, Z. p53-mdm2 - the affair that never ends. *Carcinogenesis*, 2002, vol. 23, no. 4, s. 541-7.

ARTHUR, A., RYCHKOV, G., SHI, S., KOBLAR, S.A., GRONTHOS, S. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells*, 2008, vol. 26, no. 7, s. 1787-95.

BAE, I.H., KANG, S.W., YOON, S.H., UM, H.D. Cellular components involved in the cell death induced by cisplatin in the absence of p53 activation. *Oncology Reports*, 2006, vol. 15, no. 5, s. 1175-80.

BAKKENIST, C.J., KASTAN, M.B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 2003, vol. 421, no. 6922, s. 499-506.

BEAUSÉJOUR, C.M., KRTOLICA, A., GALIMI, F., NARITA, M., LOWE, S.W., YASWEN, P., CAMPISI, J.: Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *The EMBO Journal*, 2003, vol. 22, no. 16, s. 4212-22.

BEKKER-JENSEN, S., LUKAS, C., KITAGAWA, R., MELANDER, F., KASTAN, M.B., BARTEK, J., LUKAS, J. Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *The Journal of Cell Biology*, 2006, vol. 173, no. 2, s. 195-206.

BELLOSILLO, B., COLOMER, D., PONS, G., GIL, J. Mitoxantrone, a topoisomerase II inhibitor, induces apoptosis of B-chronic lymphocytic leukaemia cells. *British Journal of Haematology*, 1998, vol. 100, no. 1, s. 142-6.

BERNDTSSON, M., HAGG, M., PANARETAKIS, T., HAVELKA, A.M., SHOSHAN, M.C., LINDER, S. Acute apoptosis by cisplatin requires induction of reactive oxygen species but is not associated with damage to nuclear DNA. *International Journal of Cancer*, 2007, vol. 120, no. 1, s. 175-80.

BHALLA, K., IBRADO, A.M., TOURKINA, E., TANG, C., GRANT, S., BULLOCK, G., HUANG, Y., PONNATHPUR, V., MAHONEY, M.E. High-dose mitoxantrone induces programmed cell death or apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Blood*, 1993, vol. 82, no. 10, s. 3133-40.

BISCHOF, O., DEJEAN, A., PINEAU, P. A review of cellular senescence: friend or foe of tumorigenesis? *International Journal of Medical Science*, 2009, vol. 25, no. 2, s.153-60.

BJERKVIG, R., JOHANSSON, M., MILETIC, H., NICLOU, S. Cancer stem cells and angiogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 2009, vol. 19, no. 5, s. 279-84.

BOLAND, M.P., FITZGERALD, K.A., O'NEILL, L.A. Topoisomerase II is required for mitoxantrone to signal nuclear factor kappa B activation in HL60 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, vol 275, no. 33, s. 25231-8.

BROUWERS, E.E., HUITEMA, A.D., BEIJNEN, J.H., SCHELLENS, J.H. Long-term platinum retention after treatment with cisplatin and oxaliplatin. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 2008, vol. 17, no. 8, s. 7.

BROZOVIC, A., OSMAK, M. Activation of mitogen-activated protein kinases by cisplatin and their role in cisplatin-resistance. *Cancer Letters*, 2007, vol. 251, no.1, s. 1-16.

CAMPISI, J., D'ADDA DI FAGAGNA, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, vol. 8, no. 9, s. 729-40.

CANMAN, C.E., LIM, D.S., CIMPRICH, K.A., TAYA, Y., TAMAI, K., SAKAGUCHI, K., APPELLA, E., KASTAN, M.B., SILICIANO, J.D. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*, 1998, vol. 281, no. 5383, s. 1677-9.

CAZZALINI, O., SCOVASSI, A.I., SAVIO, M., STIVALA, L.A., PROSPERI, E. Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A) in the DNA damage response. *Mutation Research*, 2010, vol. 704, no. 1-3, s. 12-20.

CMIELOVÁ, J., HAVELEK, R., JIROUTOVÁ, A., KOHLEROVÁ, R., SEIFRTOVÁ, M., MUTHNÁ, D., VÁVROVÁ, J., ŘEZÁČOVÁ, M. DNA damage caused by ionizing radiation in embryonic diploid fibroblasts WI-38 induces both apoptosis and senescence. *Physiological Research*, 2011, vol. 60, no. 4, s. 667-77.

CMIELOVÁ, J., HAVELEK, R., SOUKUP, T., JIROUTOVÁ, A., VÍŠEK, B., SUCHÁNEK, J., VÁVROVÁ, J., MOKRÝ, J., MUTHNÁ, D., BRŮČKOVÁ, L., FILIP, S., ENGLISH, D., ŘEZÁČOVÁ, M. Gamma radiation induces senescence in human adult mesenchymal stem cells from bone marrow and periodontal ligaments. *International Journal of Radiation Biology*, 2012, vol. 88, no. 5, s. 393-404.

CORTEZ, D., GUNTUKU, S., QUIN, J., ELLEDGE, S.J. ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science*, 2001, vol. 294, no. 5547, s. 1713-6.

COULTAS, L., STRASSER, A. The molecular control of DNA damage-induced cell death. *Apoptosis*, 2000, vol. 5, no. 6, s. 491-507.

DAMIA, G., FILIBERTI, L., VIKHANSKAYA, F., CARRASA, L., TAYA, Y., D'INCALCI, M., BROGGINI, M. Cisplatin and taxol induce different patterns of p53 phosphorylation. *Neoplasia*, 2001, vol. 3, no. 1, s. 10-6.

DEBACQ-CHAINIAUX, F., BORLON, C., PASCAL, T., ROYER, V., ELIAERS, F., NINANE, N., CARRARD, G., FRIGUET, B., DE LONBUEVILLE, F., BOFFE, S., REMACLE, J., TOUSSAINT, O. Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway. *Journal of Cell Science*, 2005, vol. 118, no. 4, s. 743-58.

DE LAAT, W.L., JASPERS, N.G., HOEIJMAKERS, J.H. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes & Development*, 1999, vol. 13, no. 7, s. 768-85.

DI LEONARDO, A., LINKE, S.P., CLARKIN, K., WAHL, G.M. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes a Development*, 1994, vol. 8, no. 21, s. 2540-51.

DIMRI, G.P. What has senescence got to do with cancer? *Cancer Cell*, 2005, vol. 7, no. 6, s. 505-12.

DIMRI, G.P., LEE, X., BASILE, G., ACOSTA, M., SCOTT, G., ROSKELLEY, C., MEDRANO, E.E., LINSKENS, M., RUBELJ, I., PEREIRA-SMITH, O. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Science*, 1995, vol. 92, no. 20, s. 9363-7.

DULIC, V., KAUFMAN, W.K., WILSON, S.J., TLSTY, T.D., LEES, E., HARPER, J.W., ELLEDGE, S.J., REED, S.I. p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell*, 1994, vol. 76, no. 6, s. 1013-23.

DUMONT, P., BURTON, M., CHEN, Q.M., GONOS, E.S., FRIPPIAT, C., MAZARATI, J.B., ELIAERS, F., REMACLE, J., TOUSSAINT, O. Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000, vol. 28, no. 3, s. 361-73.

EHNINGER, G., SCHULER, U., PROKSCH, B., ZELLER, KP., BLANZ, J. Pharmacokinetics and metabolism of mitoxantrone. *Clinical Pharmacokinetics*, 1990, vol. 18, no. 5, s. 365-80.

FAIVRE, S., CHAN, D., SALINAS, R., WOYNAROWSKA, B., WOYNAROWSKI, J.M. DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 2003, vol. 66, no. 2, s. 225-37.

FALCK, J., MAILAND, N., SYLJUASEN, R.G., LUKAS, J. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*, 2001, vol. 410, no. 6830, s. 842-7.

FAN, S., SMITH, M.L., RIVET, D.J., DUBA, D., ZHAN, Q., KOHN, K.W., FORNACE, A.J., O'CONNOR, P.M. Disruption of p53 function sensitizes breast cancer MCF-7 cells to cisplatin and pentoxifylline. *Cancer Research*, 1995, vol. 55, no. 8, s. 1649-54.

FANG, K., CHIU, C.C., LI, CH., CHANG, Y.T., HWANG, H.T. Cisplatin-induced senescence and growth inhibition in human non-small cell lung cancer cells with ectopic transfer of p16INK4a. *Oncology Research*, 2007, vol. 16, no. 10, s. 479-88.

FILION, T.M., QIAO, M., GHULE, P.N., MATTHEW, M., VAN WIJNEN, A.J., STEIN, J.L., LIAN, J.B., ALTIERI, D.C., STEIN, G.S. Survival Responses of Human Embryonic Stem Cells to DNA Damage. *Journal of Cellular Physiology*, 2009, vol. 220, no. 3, s. 586-592.

FLAIG, T.W., SU, L.J., HARRISON, G., AGARWAL, R., GLODE, L.M. Silibinin synergizes with mitoxantrone to inhibit cell growth and induce apoptosis in human prostate cancer cells. *International Journal of Cancer*, 2007, vol. 120, no. 9, s. 2028-33.

FOX, E.J. Management of worsening multiple sclerosis with mitoxantrone: a review. *Clinical Therapeutics*, 2006, vol. 28, no. 4, s. 461-74.

FRIEDENSTEIN, A.J., LATZINIK, N.W., GROSHEVA, A.G., GORSKAYA, U.F. Marrow microenvironment transfer by heterotopic transplantation of freshly isolated and cultured cells in porous sponges. *Experimental Hematology*, 1982, vol. 10, no. 2, s. 217-27.

FRIPPIAT, C., CHEN, Q.M., ZDANOV, S., MAGALHAES, J.P., REMACLE, J., TOUSSAINT, O. Subcytotoxic H₂O₂ stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, vol. 276, no. 4, s. 2531-7.

GEWIRTZ, D.A., HOLT, S.E., ELMORE, L.W. Accelerated senescence: an emerging role in tumor cell response to chemotherapy and radiation. *Biochemical Pharmacology*, 2008, vol. 76, no. 8, s. 947-57.

GOLDING, S.E., ROSENBERG, E., NEILL, S., DENT, P., POVIRK, L.F., VALERIE, K. Extracellular signal-related kinase positively regulates ataxia telangiectasia mutated, homologous recombination repair, and the DNA damage response. *Cancer Research*, 2007, vol. 67, no. 3, s. 1046-53.

GONZALES, V.M., FUERTES, M.A., ALONSO, C., PEREZ, J.M. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Molecular Pharmacology*, 2001, vol. 59, no. 4, s. 657-63.

GOODISMAN, J., SOUID, A.K. Constancy in integrated cisplatin plasma concentrations among pediatric patients. *Journal of Clinical Pharmacology*, 2006, vol. 46, no. 4, s. 443-8.

GRAZIANO, A., D'AQUINO, R., LAINO, G., PAPACCIO, G. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Reviews*, 2008, vol. 4, no. 1, s. 21-6.

GRONTHOS, S., BRAHIM, J., LI, W., FISHER, L.W., CHERMAN, N., BOYDE, A., DENBESTEN, P., ROBEY, P.G., SHI, S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *Journal of Dental Research*, 2002, vol. 81, no. 8, s. 531-5.

GRONTHOS, S., MANKANI, M., BRAHIM, J., ROBEY, P.G., SHI, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Science*, 2000, vol. 97, no. 25, s. 13625-30.

HAN, Z., WEI, W., DUNAWAY, S., DARNOWSKI, J.W., CALABRESI, P., HENDRICKSON, E.A., BALAN, K.V., PANTAZIS, P., WYCHE, J.H. Role of p21 in apoptosis and senescence of human colon cancer cells treated with camptothecin. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, vol. 277, no. 19, s. 7154-60.

HALE, A.J., SMITH, C.A., SUTHERLAND, L.C., STONEMAN, V.E., LONGTHORNE, V.L., CULHANE, A.C., WILLIAMS, G.T. Apoptosis: molecular regulation of cell death. *European Journal of Biochemistry*, 1996, vol. 237, no. 3, s. 884.

HILL, M.M., ADRAIN, C., DURIEZ, P.J., CREAGH, E.M., MARTIN, S.J. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *The EMBO Journal*, 2004, vol. 23, no. 10, s. 2134-2145.

HIRAO, A., KONG, Y.Y., MATSUOKA, S., WAKEHAM, A., RULAND, J., YOSHIDA, H., LIU, D., ELLEDGE, S.J., MAK, T.W. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science*, 2000, vol. 287, no. 5459, s. 1824-7.

HUSCHTSCHA, L.I., MOORE, J.D., NOBLE, J.R., CAMPBELL, H.G., ROYDS, J.A., BRAITHWAITE, A.W., REDDEL, R.R. Normal human mammary epithelial cells proliferate rapidly in the presence of elevated levels of the tumor suppressors p53 and p21(WAF1/CIP1). *Journal of Cell Science*, 2009, vol. 122, no. 16, s. 2989-95.

CHANG, B.D., BROUDE, E.V., DOKMANOVIC, M., ZHU, H., RUTH, A., XUAN, Y., KANDEL, E.S., LAUSCH, E., CHRISTOV, K., RONINSON, I.B. A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Research*, 1999, vol. 59, no. 15, s. 3761-7.

CHEN, Q., FISCHER, A., REAGAN, J.D., YAN, L.J., AMES, B.N. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proceedings of the National Academy of Science*, 1995, vol. 92, no. 10, s. 4337-4341.

CHEN, M.F., LIN, C.T., CHEN, W.C., YANG, C.T., CHEN, C.C., LIAO, S.K., LIU, J.M., LU, C.H., LEE, K.D. The sensitivity of human mesenchymal stem cells to ionizing radiation. *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics*, 2006, vol. 66, no. 1, s. 244-53.

CHEN, Z., GIBSON, T.B., ROBINSON, F., SILVESTRO, L., PEARSON, G., XU, B., WRIGHT, A., VADERBILT, C., COBB, M.H. MAP kinases. *Chemical Reviews*, 2001, vol. 101, no. 8, s. 2449-76.

CHO, H.J., KIM, J.K., KIM, K.D., YOON, H.K., CHO, M.Y., PARK, Y.P., JEON, J.H., LEE, E.S., BYUN, S.S., LIM, H.M., SONG, E.Y., LIM, J.S., YOON, D.Y., LEE, H.G., CHOE, Y.K. Upregulation of Bcl-2 is associated with cisplatin-resistance via inhibition of Bax translocation in human bladder cancer cells. *Cancer Letters*, 2006, vol. 237, no. 1, s. 56-66.

CHU, G. Cellular responses to cisplatin. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, vol. 269, no. 2, s. 787-90.

ITAHANA, K., DIMRI, G., CAMPISI, J. Regulation of cellular senescence by p53. *European Journal of Biochemistry*, 2001, vol. 268, no. 10, s. 2784-91.

JIANG, M., DONG, Z. Regulation and pathological role of p53 in cisplatin nephrotoxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2008, vol. 327, no. 2, s. 300-7.

JIANG, M., WANG, C.Y., HUANG, S., YANG, T., DONG, Z. Cisplatin-induced apoptosis in p53-deficient renal cells via the intrinsic mitochondrial pathway. *American Journal of Physiology*, 2009, vol. 296, no. 5, s. 983-93.

JOHNSON, G.L., LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*, 2002, vol. 298, no. 5600, s. 1911-2.

JOHNSON, G.L., NAKAMURA, K. The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, vol. 1773, no. 8, s. 1341-8.

JONES, N.A., TURNER, J., McILWRATH, A.J., BROWN, R., DIVE, C. Cisplatin- and paclitaxel-induced apoptosis of ovarian carcinoma cells and the relationship between bax and bak up-regulation and the functional status of p53. *Molecular Pharmacology*, 1998, vol. 53, no. 5, s. 819-26.

JORDAN, C.T. Cancer stem cell biology: from leukemia to solid tumours. *Current Opinion in Cell Biology*, 2004, vol. 16, no. 6, s. 708-12.

KAHLEM, P., DORKEN, B., SCHMITT, C.A. Cellular senescence in cancer treatment: friend or foe? *Journal of Clinical Investigation*, 2004, vol. 113, no. 2, s. 169-74.

KARAGIANNIS, T.C., EL-OSTA, A. Double-strand breaks: signaling pathways and repair mechanisms. *Cellular and Molecular Life Science*, 2004, vol. 6, no. 17, s. 2137-47.

KARBANOVÁ, J., SOUKUP T., SUCHÁNEK, J., PYTLÍK, R., CORBEIL, D., MOKRÝ, J. Characterization of dental pulp stem cells from impacted third molars cultured in low serum-containing medium. *Cells Tissues Organs*, 2011, vol. 193, no. 6, s. 344-65.

KASSEM, M., KRISTIANSEN, M., ABDALLAH, B.H. Mesenchymal stem cells: Cell biology and potential use in therapy. *Basic and Clinical pharmacology and Toxicology*, 2004, vol. 95, no. 5, s. 209-214.

KERKIS, I., KERKIS, A., DOZORTSEV, D., STUKART-PARSONS, G.C., GOMES MASSIRONI, S.M., PEREIRA, L.V., CAPLAN, A.I., CERRUTI, H.F. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs*, 2006, vol. 184, no. 3-4, s. 105-16.

KERR, J.F., WYLLIE, A.H., CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 1972, vol. 26, no. 4, s. 239-57.

KHANNA, K.K., LAVIN, M.F., JACKSON, S.P., MULHERN, T. D. ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. *Cell Death and Differentiation*, 2001, vol. 8, no. 11, s. 1052-65.

KINLOCH, R.A., TREHERNE, J.M., FURNESS, L.M., HAJIMOHAMADREZA, I. The pharmacology of apoptosis. *Trends in Pharmacological Science*, 1999, vol. 20, no. 1, s. 35-42.

KLENER, P. Protinádorová chemoterapie. *Galén*, 1996, s. 334-335. ISBN: 80-85824-36-1.

KLUZA, J., MARCHETTI, P., GALLEGU, M.A., LANCEL, S., FOURNIER, C., LOYENS, A., BEAUVILLAIN, J.C., BAILLY, C. Mitochondrial proliferation during apoptosis induced by anticancer agents: effects of doxorubicin and mitoxantrone on cancer and cardiac cells. *Oncogene*, 2004, vol. 23, no. 42, s. 7018-30.

KNUDSEN, E.S., WANG, J.Y. Dual mechanisms for the inhibition of E2F binding to RB by cyclin-dependent kinase-mediated RB phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*, 1997, vol. 17, no. 10, s. 5771-83.

KO, L.J., PRIVES, C. p53: puzzle and paradigm. *Genes & Development*, 1996, vol. 10, no. 9, s. 1054-72.

KOCEVA-CHYLA, A., JEDRZEJCZAK, M., SKIERSKI, M. KANIA, K., JOZWIAK, Z. Mechanisms of induction of apoptosis by anthraquinone anticancer drugs aclarubicin and mitoxantrone in comparison with doxorubicin: relation to drug cytotoxicity and caspase-3 activation. *Apoptosis*, 2005, vol. 10, no. 6, s. 1497-514.

KONSTANTAKOU, E.G., VOUTSINAS, G.E., KARKOULIS, P.K., ARAVANTINOS, G., MARGARITIS, L.H., STRAVOPODIS, D.J. Human bladder cancer cells undergo cisplatin-induced apoptosis that is associated with p53-dependent and p53-independent responses. *International Journal of Oncology*, 2009, vol. 35, no. 2, s. 401-16.

KOTALA, V., ULDRIJAN, S., NENUTIL, R., VOJTĚŠEK, B. Protein p53 a protinádorová terapie. *Klinická onkologie*, 2002, vol. 15, s. 98-100.

KREJSEK, J., KOPECKÝ, O. Klinická imunologie. *Nukleus HK*, 2004, s. 73-84. ISBN 80-86225-50-X.

KUWAHARA, D., TSUTSUMI, K., KOBAYASHI T., HASUNUMA, T., NISHIOKA, K. Caspase-9 regulates cisplatin-induced apoptosis in human head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer Letters*, 2000, vol. 148, no. 1, s. 65-71.

KYRUAKIS, J.M., AVRUCH, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological Reviews*, 2001, vol. 81, no. 2, s. 807-69.

LAN, M.L., ACHARYA, M.M., TRAN, K.K., BAHARI-KASHANI, J., PATEL, N.H., STRNADEL, J., GIEDZINSKI, E., LIMOLI, C.L. Characterizing the radioresponse of pluripotent and multipotent human stem cells. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no.12, e50048.

LI, J., LAW, H.K., LAU, Y.L., CHAN, G.C. Differential damage and recovery of human mesenchymal stem cells after exposure to chemotherapeutic agents. *British Journal of Haematology*, 2004, vol. 127, no. 3, s. 326-34.

LI, W., MELTON, D.W. Cisplatin regulates the MAPK kinase pathway to induce increased expression of DNA repair gene ERCC1 and increase melanoma chemoresistance. *Oncogene*, 2012, vol. 31, no. 19, s. 2412-22.

LIEBER, M.R., MA, Y., PANNICKE, U., SCHWARZ, K. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2003, vol. 4, no. 9, s. 712-20.

LIU, X., KIM, C.N., YANG, J., JEMMERSON, R., WANG, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 1996, vol. 86, no. 1, s. 147-57.

LUKAS, C., BARTKOVA, J., LATELLA, L., FALCK, J., MAILAND, N., SCHROEDER, T., SEHESTED, M., LUKAS, J., BARTEK, J. DNA damage-activated kinase Chk2 is independent of proliferation or differentiation yet correlates with tissue biology. *Cancer research*, 2001, vol. 61, no. 13, s. 4990-3.

MA, Y., LU, H., SCHWARZ, K., LIEBER, M.R. Repair of double-strand DNA breaks by the human nonhomologous DNA end joining pathway: the iterative processing model. *Cell Cycle*, 2005, vol. 4, no. 9, s. 1193-200.

MANDIC, A., HANSSON, J., LINDER, S., SHOSHAN, M.C. Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, vol. 278, no. 11, s. 9100-6.

MASOPUST, J. Kmenové buňky a vznik nádorového onemocnění. Tumorigeneze jako onemocnění kmenových buněk (1.část). *Labor Aktuell*, 2008, vol. 1, s. 4-8.

MCKENNA, E., TRAGANOS, F., ZHAO, H., DARZYNKIEWICZ, Z. Persistent DNA damage caused by low levels of mitomycin C induces irreversible cell senescence. *Cell Cycle*, 2012, vol. 11, no. 16, s. 3132-40.

MELINO, G., BERNASSOLA, F., RANALLI, M., YEE, K., ZONG, W.X., CORAZZARI, M., KNIGHT, R.A., GREEN, D.R., THOMPSON, C., VOUSDEN, K.H.

p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, vol. 279, no. 9, s. 8076-83.

MENG, A., WANG, Y., VAN ZANT, G., ZHOU, D. Ionizing radiation and busulfan induce premature senescence in murine bone marrow hematopoietic cells. *Cancer Research*, 2003, vol. 63, no. 17, s. 5414-9.

MICHAEL, D., OREN, M. The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Seminars in Cancer Biology*, 2003, vol. 13, no. 1, s. 49-58.

MILNE, D.M., CAMPBELL, D.G., CAUDWELL, F.B., MEEK, D.W. Phosphorylation of the tumor suppressor protein p53 by mitogen-activated protein kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, vol. 269, no. 12, s. 9253-60.

MIRZAYANS, R., ANDRAIS, B., HANSEN, G., MURRAY, D. Role of p16(INK4A) in Replicative Senescence and DNA Damage-Induced Premature Senescence in p53-Deficient Human Cells. *Biochemistry Research International*, 2012, 951574. doi: 10.1155/2012/951574.

MUELLER, L.P., LUETZKENDORF, J., MUELLER, T., REICHELT, K., SIMON, H., SCHMOLL, H.J. Presence of mesenchymal stem cells in human bone marrow after exposure to chemotherapy: evidence of resistance to apoptosis induction. *Stem Cells*, 2006, vol. 24, no. 12, s. 2753-65.

MUELLER, T., VOIGT, W., SIMON, H., FRUEHAUF, A., BULANKIN, A., GROTHEY, A., SCHMOLL, H.J. Failure of activation of caspase-9 induces a higher threshold for apoptosis and cisplatin resistance in testicular cancer. *Cancer Research*, 2003, vol. 63, no. 2, s. 513-21.

MUTHNÁ, D., SOUKUP, T., VÁVROVÁ, J., MOKRÝ, J., CMIELOVÁ, J., VÍŠEK, B., JIROUTOVÁ, A., HAVELEK, R., SUCHÁNEK, J., FILIP, S., ENGLISH, D., ŘEZÁČOVÁ, M. Irradiation of adult human dental pulp stem cells provokes activation of p53, cell cycle arrest, and senescence but not apoptosis. *Stem Cells and Development*, 2010, vol. 19, no. 12, s. 1855-62.

NAKAMURA, A.J., CHIANG, Y.J., HATHCOCK, K.S., HORIKAWA, I., SEDELNIKOVA, O.A., HODES, R.J., BONNER, W.M. Both telomeric and non-telomeric DNA damage are determinants of mammalian cellular senescence. *Epigenetics and Chromatin*, 2008, vol. 6, no.1, s. 1-12.

NANIWA, J., SATO, S., SHIMADA, M., OISHI, T., TERAOKA, N., KIGAWA, J., HARADA, T. Activation of the mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway overcomes cisplatin resistance in ovarian carcinoma cells. *International Journal of Gynecological Cancer*, 2012, vol. 22, no. 6, s. 922-9.

NONAKA, M., ITAMUCHI, H., KAWAGUCHI, W., KUDOH, A., SATO, S., UEGAKI, K., PABLA, N., HUANG, S., MI, Q.S., DANIEL, R., DONG, Z. ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, vol. 283, no. 22, s. 6572-83.

PABLA, N., HUANG, S., MI, Q.S., DANIEL, R., DONG, Z. ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, vol. 283, no. 10, s. 6572-83.

PERSONS, D.L., YAZLOVITSKAYA, E.M., CUI, W., PELLING, J.C. Cisplatin-induced activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian carcinoma cells: inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity increases sensitivity to cisplatin. *Clinical Cancer Research*, 1999, vol. 5, no. 5, s. 1007-14.

PESTELL, K.E., HOBBS, S.M., TITLEY, J.C., KELLAND, L.R., WALTON, M.I. Effect of p53 status on sensitivity to platinum complexes in a human ovarian cancer cell line. *Molecular Pharmacology*, 2000, vol. 57, no. 3, s. 503-11.

PETERA, J. Obecná onkologie. *Karolinum*, 2005, s. 15-16. ISBN 8024609681.

PLATANIAS, L.C. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood*, 2003; vol. 101, no. 12, s. 4667-4679.

POEHLMANN, A., ROESSNER, A. Importance of DNA damage checkpoints in the pathogenesis of human cancers. *Pathology Research and Practice*, 2010, vol. 206, no. 9, s. 591-601.

PORADA, C.D., ALMEIDA-PORADA, G. Mesenchymal stem cells as therapeutics and vehicles for gene and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2010, vol. 62, no. 12, s. 1156-66.

PRENDERGAST, Á.M., CRUENT-HENNEQUART, S., SHAW, G., BARRY, F.P., CARTY, M.P. Activation of DNA damage response pathways in human mesenchymal stem cells exposed to cisplatin or γ -irradiation. *Cell Cycle*, 2011, vol. 10, no. 21, s. 3768-77.

PROBIN, V., WANG, Y., ZHOU, D. Busulfan-induced senescence is dependent on ROS production upstream of the MAPK pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, 2007, vol. 42, no. 12, s. 1858-65.

QI, M., ELION, E.A. MAP kinase pathways. *Journal of Cell Science*, 2005, vol. 118, no. 16, s. 3569-72.

RAY, S., PONNATHPUR, V., HUANG, Y., TANG, C., MAHONEY, M.E., IBRADO, A.M., BULLOCK, G., BHALLA, K. 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine-, mitoxantrone-, and paclitaxel-induced apoptosis in HL-60 cells: improved method for detection of internucleosomal DNA fragmentation. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 1994, vol. 34, no. 5, s. 365-71.

RICHARD, B., LAUNAY-ILIADIS, M.C., ILIADIS, A., JUST-LANDI, S., BLAISE, D., STOPPA, A.M., VIENS, P., GASPARD, M.H., MARANINCHI, D., CANO, J.P. Pharmacokinetics of mitoxantrone in cancer patients treated by high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *British Journal of Cancer*, 1992, vol. 65, no. 3, s. 399-404.

ROBLES, S.J., ADAMI, G.R. Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene*, 1998, vol. 16, no. 9, s. 1113-23.

ROUX, P.P., BLENIS, J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, vol. 68, no. 2, s. 320-44.

RUDOLF, E., ČERVINKA, M. Stress responses of human dermal fibroblasts exposed to zinc pyrithione. *Toxicology Letters*, 2011, vol. 204, no. 2-3, s. 164-73.

RUDOLF, E., JOHN, S., ČERVINKA, M. Irinotecan induces senescence and apoptosis in colonic cells in vitro. *Toxicology Letters*, 2012, vol. 214, no. 1, s. 1-8.

ŘEZÁČOVÁ, M., VÁVROVÁ J. Molekulární mechanismy účinku ionizujícího záření. *Nucleus HK*, 2011, ISBN 978-80-87009-82-6.

SANCHEZ-PRIETO, R., ROJAS, J.M., TAYA, Y., GUTKING, J.S. A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the transcriptional activation of p53 on genotoxic stress by chemotherapeutic agents. *Cancer Research*, 2000, vol. 60, no. 9, s. 2464-72.

SEGER, R., KREBS, E.G. The MAPK signaling cascade. *The FASEB Journal*, 1995, vol. 9, no. 9, s. 726-35.

SEIFRTOVÁ, M., HAVELEK, R., CHMELAŘOVÁ, M., CMIELOVÁ, J., MUTHNÁ, D., STOKLASOVÁ, A., ZEMÁNKOVÁ, S., ŘEZÁČOVÁ, M. The effect of ATM and ERK1/2 inhibition on mitoxantrone-induced cell death of leukaemic cells. *Folia Biologica*, 2011, vol. 57, no. 2, s. 74-81.

SEIFRTOVÁ, M., HAVELEK, R., CMIELOVÁ, J., JIROUTOVÁ, A., SOUKUP, T., BRŮČKOVÁ, L., MOKRÝ, J., ENGLISH, D., ŘEZÁČOVÁ, M. The response of human ectomesenchymal dental pulp stem cells to cisplatin treatment. *International Endodontic Journal*, 2012, vol. 45, no. 5, s. 401-12.

SERAKINCI, N., CHRISTENSEN, R., GRAAKJAER, J., CAIRNEY, C.J., KEITH, W.N., ALSNER, J., SARETZKI, G., KOLVRAA, S. Ectopically hTERT expressing adult human mesenchymal stem cells are less radiosensitive than their telomerase negative counterpart. *Experimental Cell Research*, 2007, vol. 313, no. 5, s. 1056-67.

SHAPIRO, G.I., HARPER, J.W. Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control. *The Journal of Clinical Investigation*, 1999, vol. 104, no. 12, s. 1645-53.

SHERR, C.J., ROBERTS, J.M. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes and Development*, 1995, vol. 9, no. 10, s. 1149-63.

SCHMITT, C.A. Cellular senescence and cancer treatment. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, vol. 1775, no. 1, s. 5-20.

SCHÖNMEYR, B.H., WONG, A.K., SOARES, M., FERNANDEZ, J., CLAVIN, N., MEHRARA, B.J. Ionizing radiation of mesenchymal stem cells results in diminution of the precursor pool and limits potential for multilineage differentiation. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2008, vol. 122, no. 1, s. 64-76.

SIDDIK, Z.H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 2003, vol. 22, no. 47, s. 7265-79.

SIEBERT, R., WILLERS, C.P., OPALKA B. Role of the cyclin-dependent kinase 4 and 6 inhibitor gene family p15, p16, p18 and p19 in leukemia and lymphoma. *Leukemia and Lymphoma*, 1996, vol. 23, no. 5-6, s. 505-20.

SONG, Z., STELLER, H. Death by design: mechanism and control of apoptosis. *Trends in Cell Biology*, 1999, vol. 9, no. 12, s. 49-52.

SORENSEN, C.M., EASTMAN, A. Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double-strand breaks. *Cancer Research*, 1988, vol. 48, no. 16, s. 4484-8.

SUCHÁNEK, J., SOUKUP, T., IVANČÁKOVÁ, R., KARBANOVÁ, J., HUBKOVÁ, V., PYTLÍK, R., KUČEROVÁ, L. Human dental pulp stem cells--isolation and long term cultivation. *Acta Medica*, 2007, vol. 50, no. 3, s. 195-201.

SUCHÁNEK, J., SOUKUP, T., VÍŠEK, B., IVANČÁKOVÁ, R., KUČEROVÁ, L., MOKRÝ, J. Dental pulp stem cells and their characterization. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky*, 2009, vol. 153, no. 1, s. 31-5.

SUCHÁNEK, J., VÍŠEK, B., SOUKUP, T., EL-DIN MOHAMED, S.K., IVANČÁKOVÁ, R., MOKRÝ, J., ABOUL-EZZ, E.H., OMRAN, A. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth-isolation, long term cultivation and phenotypical analysis. *Acta Medica*, 2010, vol. 53, no. 2, s. 93-9.

TANG, D., WU, D., HIRAO, A., LAHTI, J.M., LIU, L., MAZZA, B., KIDD, V.J., MAK, T.W., INGRAM, A.J. ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, vol. 277, no. 15, s. 12710-7.

TE POELE, R.H., OKOROKOV, A.L., JARDINE, L., CUMMINGS, J., JOEL, S.P. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Research*, 2002, vol. 62, no. 6, s. 1876-83.

THOMPSON, T., TOVAR, C., YANG, H., CARVAJAL, D. VU, B.T., XU, Q., WAHL, G.M., HEIMBROOK, D.C., VASSILEV, L.T. Phosphorylation of p53 on key serines is dispensable for transcriptional activation and apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, vol. 279, no. 51, s. 53015-22.

THORNBERRY, N.A., LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. *Science*, vol. 281, no. 5381, s. 1312-6.

TODD, R.C., LIPPARD, S.J. Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *Metallomics*, 2009, vol. 1, no. 4, s. 280-91.

TYSNES, B.B., BJERKVIG, J. Cancer initiation and progression: involvement of stem cells and the microenvironment. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, vol. 1775, no. 2, s. 283-97.

ULDRIJAN, S., KOTALA, V., VOJTĚŠEK, B. Regulace stability a aktivity nádorového supresoru p53. *Chemické Listy*, 2002, vol. 96, s. 145-149.

VAN BELLE, S.J., DE PLANQUE, M.M., SMITH, I.E., VAN OOSTEROM, A.T., SCHOEMAKER, T.J., DENEVE, W., MCVIE, J.G. Pharmacokinetics of mitoxantrone in humans following single-agent infusion or intra-arterial injection therapy or combined-agent infusion therapy. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 1986, vol. 18, no. 1, s. 27-32.

VASILEVSKAYA, Y., O'DWYER, P.J. Role of Jun and Jun kinase in resistance of cancer cells to therapy. *Drug Resistance Updates*, 2003, vol. 6, no. 3, s. 147-56.

VÁVROVÁ, J., ŘEZÁČOVÁ, M. Apoptosis and Senescence - Main Mechanism of Accelerated Aging of haematopoietic cells after irradiation. *Acta Veterinaria Brno*, 2009, vol. 78, s. 205-217.

VÁVROVÁ, J., STULÍK, J., MAREKOVÁ, M., VOKURKOVÁ, D. Indukce apoptózy protinádorovými látkami a ionizujícím zářením. *Učební texty Vojenské lékařské akademie Jana Evangelisty Purkyně*, 2002, vol. 333, no. 1, s. 44.

VÁVROVÁ, J., VOKURKOVÁ, D., MAREKOVÁ, M., BLÁHA, M., JEBAVÝ, J., FILIP, S. Antiapoptotic cytokine IL-3 + SCF + FLT3L influence on proliferation of gamma-irradiated AC133+/CD34+ progenitor cells. *Folia Biologica*, 2002, vol. 48, no. 2, s. 51-57.

VON ZGLINICKI, T., SARETZKI, G., LADHOFF, J., D'ADDA DI FAGAGNA, F., JACKSON, S.P. Human cell senescence as a DNA damage response. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2005, vol. 126, no. 1, s. 111-7.

WANG, P., SONG, J.H., SONG, D.K., ZHANG, J., HAO, C. Role of death receptor and mitochondrial pathways in conventional chemotherapy drug induction of apoptosis. *Cellular Signalling*, 2006, vol. 18, no. 9, s. 1528-35.

WANG, X., MARTINDALE, J.L., HOLBROOK, N.J. Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, vol. 275, no. 50, s. 39435-43.

WANG, X., WONG, S.C., TSAO, S.W., FUNG, K.H., KWONG, D.L., SHAM, J.S., NICHOLLS, J.M. Evidence of cisplatin-induced senescent-like growth arrest in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Research*, 1998, vol. 58, no. 22, s. 5019-22.

WARD, I.M., CHEN, J. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, vol. 276, no. 51, s. 47759-62.

WOESSMANN, W., CHEN, X., BORKHARDT, A. Ras-mediated activation of ERK by cisplatin induces cell death independently of p53 in osteosarcoma and neuroblastoma cell lines. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2002, vol. 50, no. 5, s. 397-404.

WU, G.S. The functional interactions between the p53 and MAPK signaling pathways. *Cancer Biology and Therapy*, 2004, vol. 3, no. 2, s. 156-61.

YALVAC, M.E., RAMAZANOGLU, M., RIZVANOV, A.A., SAHIN, F., BAYRAK, O.F., SALLI, U., PALOTÁS, A., KOSE, G.T. Isolation and characterization of stem cells derived from human third molar tooth germs of young adults: implications in neo-vascularization, osteo-, adipo- and neurogenesis. *Pharmacogenomics Journal*, 2010, vol. 10, no. 2, s. 105-13.

YEH, P.Y., CHUANG, S.E., YEH, K.H., SONG, Y.C., EA, C.K., CHENG, A.L. Increase of the resistance of human cervical carcinoma cells to cisplatin by inhibition of the MEK to ERK signaling pathway partly via enhancement of anticancer drug-induced NF kappa B activation. *Biochemical Pharmacology*, 2002, vol. 63, no. 8, s. 1423-30.

ZAMBLE, D.B., JACKS, T., LIPPARD, S.J. p53-Dependent and -independent responses to cisplatin in mouse testicular teratocarcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Science*, 1998, vol. 95, no. 11, s. 6163-8.

ZHANG, P., LIU, S.S., NGAN, H.Y. TAp73-mediated the activation of c-Jun N-terminal kinase enhances cellular chemosensitivity to cisplatin in ovarian cancer cells. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 8, e42985.

ZHANG, W., LIU, H.T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*, 2002, vol. 12, no. 1, s. 9-18.

ZHAO, W., LIN, Z.X., ZHANG, Z.Q. Cisplatin-induced premature senescence with concomitant reduction of gap junctions in human fibroblasts. *Cell Research*, 2004, vol. 14, no. 1, s. 60-6.

ZHAO, H., PIWNICA-WORMS, H. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Molecular and Cellular Biology*, 2001, vol. 21, no. 13, s. 4129-39.

ZHAO, H., TRAGANOS, F., DARZYNKIEWICZ, Z. Phosphorylation of p53 on Ser15 during cell cycle caused by Topo I and Topo II inhibitors in relation to ATM and Chk2 activation. *Cell Cycle*, 2008, vol. 7, no. 19, s. 3048-55.